

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE HONGOS ASOCIADOS A  
SÍNTOMAS DEL AÑUBLO DE LA VAINA DEL ARROZ (*oryza sativae* L.)  
EN COLOMBIA**

**FABIO ESCOBAR RIOJA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACION NACIONAL DE POSGRADOS  
PALMIRA  
2.012**

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE HONGOS ASOCIADOS A  
SÍNTOMAS DEL AÑUBLO DE LA VAINA DEL ARROZ (*oryza sativae* L.)  
EN COLOMBIA**

**FABIO ESCOBAR RIOJA**

**Trabajo de tesis como requisito parcial para optar al título de Máster  
en Ciencias Agropecuarias Énfasis Mejoramiento**

**Dirigido por:**

**Fernando Correa-Victoria**

**Hernando Ramírez**

**Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACION GENERAL DE POSGRADOS  
PALMIRA  
2.012**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE PALMIRA

**ESCUELA DE POSGRADO**

**ACTA DE JURADO DE TESIS**

**MAESTRIA CIENCIAS AGRARIAS  
ENFASIS: FITOMEJORAMIENTO**

En Palmira a los (12) doce días del mes de Diciembre de 2005, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores: FRANCO ALIRIO VALLEJO CABRERA, JOSE ARIEL GUTIERREZ y GUSTAVO ADOLFO PRADO P.

Para calificar la Tesis de Grado de:

**FABIO ESCOBAR RIOJA**

Titulada:

**"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ASOCIADOS A SINTOMAS DEL AÑUBLO DE LA VAINA EN ARROZ EN COLOMBIA"** bajo la dirección de los doctores Fernando Correa y Hernando Ramírez

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los Doctores FRANCO ALIRIO VALLEJO CABRERA, JOSE ARIEL GUTIERREZ y GUSTAVO ADOLFO PRADO P. y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADO X

REPROBADO       

  
FRANCO ALIRIO VALLEJO C.

  
JOSE ARIEL GUTIÉRREZ

  
GUSTAVO ADOLFO PRADO P.

## **AGRADECIMENTOS**

Gracias a Dios por su presencia amorosa y permitirme andar los caminos recorridos siendo testigo de la naturaleza humana, especialmente de la nobleza que abunda y que me han manifestado infinidad de gentes.

Gracias a mi familia paterna por permitirme ser yo todo el tiempo, desde niño inquieto hasta el ser adulto de hoy, determinado, definido e impulsado por los principios de solidaridad y unión.

Gracias a mis amig@s con los que he compartido desde el colegio, pregrado, maestría y el trabajo científico, esa maravillosa fascinación por el acto de aprender: Héctor Jairo Motato, Álvaro Mosquera, Edgar Mena, Alejandra Cubillos, Claudia Gordillo y demás amigos de los tiempos del Grupo de Investigación Futuro del CASD (GIF año 1.984), GETEG, Edgar Barrera, Gerardo Chois, Ricardo Tazcón, Maricel Marín, Carlitos, Juan Carlos Sandino, UNIVALLE, CIAT y la UNAL.

Gracias a mis profesores y especialmente a mis mentores quienes con su ejemplo mantienen vivo el camino de la formación, la entrega y el amor a la ciencia: Dr. Joe Tohme, Dr. Fernando Correa-Victoria, Profesor Abiel Fernández, Profesor Enrique Lozano, Profesor Jaime Candelo, Profesor Álvaro Alegría, Profesor Enrique Bravo, Profesor Edgar Díaz, Profesora Graciela Valderrama, Profesora Inés Sánchez, Dr. Rodrigo Sarria, Profesor J. C., profesor Ariel Fernández.

Gracias al CIAT y su familia conformada por personas generosas y entrañables que nutrieron mi formación científica en un ambiente lleno de afecto y camaradería, que permitieron mi realización personal y la ejecución de este trabajo: Rodrigo Sarria, Vicky Montenegro, Dr. Joe Tohme, Dr. Fernando Correa-Victoria, Gustavo Prado, Girlena Aricapa, Doña Nidia, Don Benjamín, Roosevelt Escobar, Patricia Gutiérrez, Dr. William Roca, Gerardo Gallego, Fernando Ángel, Fernando Rodríguez, Jaime Vargas, Camilo Flórez, Fernando Tenjo, Orlando, Edgar Barrera, Gerardo Chois, Constanza Quintero, Lucía Chávez, Iván Lozano, Jairo Díaz, Daniel Costeño, Nelson Rogero, Vanessa Segovia, Juan Diego Palacios, Luisa Fory, Faustina Giraldo, etc.

Gracias a la Universidad del Valle y con ella a mi querido país y mi familia por financiar a través de la educación pública y recursos propios, toda mi educación.

La Facultad y los Jurados de tesis  
no se harán responsables de las ideas  
emitidas por el autor.  
“Artículo 24, resolución 04 de 1974”.

## CONTENIDO

pág.

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. REVISION DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
1.1 GENERALIDADES DEL ARROZ.....	18
1.2 GENERALIZADES DEL AÑUBLO DE LA VAÍNA DEL ARROZ.....	21
1.2.1 Importancia del añublo de la vaina del arroz.....	21
1.2.2 Agente causal de la enfermedad.....	21
1.2.3 Clasificación de las especies del genero <i>Rhizoctonia</i> .....	24
1.2.4 Complejo <i>Rhizoctonia solani</i> y su Caracterización.....	24
1.2.4.1 Condición nuclear de células vegetativas.....	25
1.2.4.2 Grupos de Anastomosis AG.....	25
1.2.4.3 Genes de RNA ribosomales.....	26
1.2.4.4 Familias de secuencias ERIC y REPs.....	27
1.2.5 Relaciones inter específicas en el género <i>Rhizoctonia</i> .....	28
1.2.6 Relaciones intra específicas en el complejo <i>R. solani</i> .....	28
1.2.6.1 Clasificación de cepas de <i>Rhizoctonia</i> mediante grupos de anastomosis.....	29
1.2.6.2 Desventajas de clasificación de <i>Rhizoctonia</i> por Grupos de Anastomosis.....	29
1.2.7 Identificación de especies del genero <i>Rhizoctonia</i> usando genes de RNA ribosomales.....	29

1.2.8 Identificación y caracterización de grupos de anastomosis del complejo <i>Rhizoctonia</i> usando genes de rDNA ribosomal.....	30
1.2.9 Detección de sexualidad en <i>R. solani</i> usando marcadores RFLP's...	30
1.3 SÍNTOMAS Y DIAGNOSTICO.....	31
1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	31
1.5. CICLO DE VIDA DEL PATÓGENO.....	32
1.6 ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO DE LA ENFERMEDAD.....	32
1.6.1 Control Cultural.....	33
1.6.2 Control Biológico.....	33
1.6.3 Control químico.....	33
1.6.4 Resistencia Varietal.....	34
1.6.4.1 Mecanismos de resistencia a patógenos en plantas.....	34
1.6.4.2 Resistencia varietal al añublo de la vaina en el arroz.....	35
<b>2. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>37</b>
2.1 UBICACIÓN.....	37
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	37
2.2.1 Población del hongo.....	37
2.2.2 Aislamiento del hongo.....	41
2.3 EXTRACCIÓN DE ADN.....	42
2.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizoctonia oryzae</i> y <i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i> VIA PCR.....	43
2.5 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES RAPD EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	43

2.6 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS ESPACIADORAS DE TRASCRIPTO INTERGÉNICO ITS, DE LOS GENES rDNA RIBOSOMAL.....	44
2.6.1 Amplificación vía PCR de las secuencias ITS.....	44
2.6.2 Análisis de restricción de secuencias ITS.....	45
2.6.3 Análisis Estadístico de los Marcadores ITS.....	45
2.6.3.1 Análisis de similaridad Genética.....	46
2.6.3.2 Análisis de Correspondencia Múltiple.....	46
2.7 REVISIÓN MORFOLÓGICA.....	46
2.8 ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD.....	47
2.8.1 Metodología de inoculación.....	48
2.8.2 Evaluación de plantas.....	49
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	51
3.1.1 Población del hongo, aislamientos monotálicos.....	51
3.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizoctonia oryzae</i> y <i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i> VIA PCR.....	51
3.3 DETERMINACIÓN DE VARIANTES RAPD EN LA POBLACIÓN.....	57
3.4 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS ESPACIADORAS DE TRASCRIPTO INTERGENICO ITS, DE LOS GENES DE rDNA RIBOSOMAL.....	59
3.4.1 Amplificación vía PCR de las secuencias ITS.....	59
3.4.2 Análisis de restricción de las secuencias ITS.....	60
3.4.3 análisis estadístico de los marcadores ITS.....	62
3.4.3.1 Análisis de similaridad genética de los productos de PCR (AS-PCR) de las regiones ITS3-ITS4 sin digerir.....	62



3.4.3.2 Análisis de Similaridad Genética del estudio de restricción de la región ITS3-ITS4.....	64
3.4.3.3 Análisis de Correspondencia Múltiple ACM.....	69
3.5 ESTUDIOS DE MORFOLOGÍA.....	71
3.6 ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD.....	73
3.6.1 Patogenicidad de aislamientos con morfología atípica a <i>R. solani</i> ...	74
3.6.2 Patogenicidad de aislamientos con morfología típica <i>R. solani</i> .....	77
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE TABLAS

pág.

<b>Tabla 1.</b> Diferentes hospederos del patógeno <i>Rhizoctonia solani</i> establecidos en diferentes lugares del mundo.....	23
<b>Tabla 2.</b> Listado de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia usados en este Estudio.....	38
<b>Tabla 3.</b> Origen geográfico de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	41
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de primers para PCR usados en este estudio.....	44
<b>Tabla 5.</b> Diez y ocho aislamientos que representan la diversidad genética molecular de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	47
<b>Tabla 6.</b> Identificación molecular de especies vía PCR con primers especie específicos de Johansen y colaboradores (1.998) y asignación de grupos genéticos AGS del análisis de restricción de la región ITS3/ITS4 del ADN ribosomal en la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	53
<b>Tabla 7.</b> Aislamientos con clasificación molecular de especie con resultados ambiguos en la población CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	57
<b>Tabla 8.</b> Relación de las distintas estructuras genéticas o grupos (g) de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia a través del análisis de similaridad genética de la región ITS3/ITS4 sin digerir, con digestiones individuales y con el conjunto de digestiones con 5 enzimas de restricción.....	63
<b>Tabla 9.</b> Relación de la composición de grupos genéticos del análisis de similaridad genética aplicado a los productos de PCR sin digerir, comparado con los grupos genéticos del ACM del mismo PCR digerido con cinco enzimas de restricción.....	66
<b>Tabla 10.</b> Reclasificación de los aislamientos de los grupos genéticos AS-PCR del A. C. M. de los productos de PCR sin digerir hacia los grupos	

genéticos AGS del análisis de similaridad genética de la digestión de dichos fragmentos con cinco enzimas de restricción.....67

**Tabla 11.** Composición de los grupos genéticos GP del análisis de correspondencia múltiple de los productos de PCR de la región ITS3-ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....70

**Tabla 12.** Morfología de 18 aislamientos representativos de 13 de los 14 grupos de diversidad genética de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....73

**Tabla 13.** Promedios de porcentaje de área de planta afectada (%APA) del estudio de patogenicidad de 18 aislamientos representativos de 13 de los 14 grupos de diversidad genética de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....74

## LISTA DE FIGURAS

pág.

- Figura 1.** Fotografía en estereoscopio de micelio de *R. solani* AG1-IA, aislamiento 2399 crecido por 16 horas en medio de cultivo PDA.....42
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa 1% de ADN total de algunos aislamientos de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....43
- Figura 3.** Esquema de los genes nucleares de rDNA ribosomal con indicación de la posición de los primers ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5.....45
- Figura 4.** Inoculación de la variedad de arroz Fedearroz 50 con inóculo del hongo *Rhizoctonia solani* AG1-IA, aislamiento 2399.....48
- Figura 5.** Cámara húmeda de plástico con techos, paredes y compuertas herméticas que mantienen la humedad relativa entre 80% y 100%, en la que se realiza la inoculación de los aislamientos de *R. solani* y demás hongos del estudio.....49
- Figura 6.** Plano de inoculación de 18 aislamientos correspondientes a 13 de 14 grupos genéticos AGS de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia sobre cinco cultivares.....50
- Figura 7.** Escala de evaluación en invernadero de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz (IRRI) modificada por CIAT.....50
- Figura 8.** Electroforesis en geles de agarosa 1,5% del PCR especie específico para la identificación de la especie del hongo *Rhizoctonia solani* en poblaciones de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia con los primers especie específicos GMROS e ITS1 de Johansen y colaboradores (1998).....56
- Figura 9.** Electroforesis en agarosa 1,5% del RAPD DNA-Fingerprinting de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia con primer RAPD hipervariable 91298.....59
- Figura 10.** Figura 10. Electroforesis en geles de agarosa de amplificación PCR de la región ITS3 a ITS4 de los genes de ADN ribosomal de la

colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....61

**Figura 11.** Electroforesis en geles de agarosa al 3% de la digestión con la enzima de restricción MboI de los productos de PCR de la región ITS3/ITS4 de los genes de ADN ribosomal de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....61

**Figura 12.** Dendograma de similaridad genética de 140 aislamientos de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz basado en la amplificación vía PCR de la región ITS3/ITS4 de los genes de rDNA ribosomal.....63

**Figura 13.** Dendograma de similaridad genética de 140 aislamientos de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz, basado en el análisis de restricción de los productos de PCR de la región ITS3/ITS4 de los genes de rDNA ribosomal.....65

**Figura 14.** Figura 14. Distribución en tres dimensiones de los 4 grupos genéticos principales (grupos GP) del ACM hecho a la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del Añublo de la vaina del arroz en Colombia.....71

**Figura 15.** Fotografía de la apariencia morfológica de 18 aislamientos representativos de 13 de los 14 los grupos genéticos que componen la variabilidad genética de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....72

**Figura 16.** Grafica de evaluación de porcentajes de área de planta afectada (%APA) de cinco cultivares de arroz inoculados con 18 aislamientos representativos de la variabilidad genética de la región ITS3 a ITS4 del ADN ribosomal de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....75

**Figura 17.** Figura 17. Afecciones en tallos de plantas de la variedad Fedearroz 50 inoculadas e incubadas en condiciones controladas de invernadero con aislamientos de morfología atípica a *R. solani* de esclerocios redondos medianos y que no reproducen la enfermedad del añublo de la vaina del arroz.....76

**Figura 18.** Sintomatología típica de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz reproducida bajo condiciones controladas de invernadero.....76

## ANEXOS

pág.

<b>ANEXO A.</b> Protocolo de extracción de ADN de Matthew y Mawhorr.....	87
<b>ANEXO B.</b> Tampón de Extracción y de carga para electroforesis.....	88
<b>ANEXO C.</b> Formula de los medios de cultivo, vitaminas, minerales, elementos traza y sales.....	88
<b>ANEXO D...</b> Condiciones de amplificación de PCR y RAPD.....	90
<b>ANEXO E.</b> Matriz de datos de PCR y digestión con cinco enzimas de la región ITS3 a ITS4 de los genes de ADN ribosomal de la población CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	92
<b>ANEXO F.</b> Composición de grupos genéticos establecidos mediante análisis de correspondencia múltiple (ACM) de los productos de restricción del PCR de la región ITS3 a ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	95
<b>Anexo G.</b> Frecuencia de hospederos por grupo genético principal GP del Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) de los productos de PCR ITS3/ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	97
<b>Anexo H.</b> Frecuencia de Fecha de colecta por grupo genético principal GP del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de los productos de PCR ITS3/ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	98
<b>Anexo I.</b> Frecuencia de localidad por grupo genético principal GP del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de los productos de PCR ITS3/ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	99
<b>Anexo J.</b> Evaluación del porcentaje de área de planta afectada (% APA) de la inoculación de 18 aislamientos que representan la diversidad genética AGS del la región ITS3/ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.....	100

## RESUMEN

Se estudiaron 130 aislamientos de hongos asociados a síntomas del añublo de la vaina del arroz procedentes de 24 cultivares de arroz obtenidos de 23 localidades de los departamentos del Valle del Cauca, Casanare, Meta, Tolima y Huila (Colombia), mas 10 aislamientos control. ADN de cada aislamiento fue extraído y amplificado vía PCR con primers específicos para la identificación de las especies *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae* y por el primer RAPD 91293. Dos regiones de los genes rDNA ribosomal determinadas por las combinaciones de primers ITS1-ITS2 e ITS3-ITS4 fueron amplificadas por PCR y posteriormente digeridas con cinco enzimas de restricción. Un Análisis de correspondencia múltiple de los datos del estudio de restricción de los productos de PCR ITS3/ITS4 mostró que la población se componía de 5 grandes grupos genéticos; dichos grupos fueron confirmados y refinados por un análisis de similaridad genética (Análisis Global de similaridad AGS) que clasificó la estructura de la población en 14 grupos genéticos (grupos AGS) coincidentes en gran medida con el origen, morfología y datos de pasaporte de los aislamientos. Los productos de PCR y de restricción de la regiones ITS1-ITS2 rDNA no fueron estudiadas al no poder ser resueltos adecuadamente en la matriz de electroforesis utilizada.

El estudio de PCR con los primers especie específicos identificaron al 80.7% de la población como de la especie *Rhizoctonia solani* y el 18.5% como ninguna de las especies de *Rhizoctonia* evaluadas; cuatro aislamientos fueron clasificados ambiguamente en más de una de estas tres especies. El establecimiento de variantes RAPD con el estudio del primer 91298 mostró que la población estaba constituida por más de 14 patrones RAPD diferentes y que aislamientos de distintos hospederos, localidades y fechas de colecta, podrían compartir un mismo patrón RAPD; Así como también los aislamientos de un mismo hospedero, localidad y año de colecta podrían mostrar patrones diferentes.

Para tener un acercamiento a la composición patogénica y morfológica de los 14 grupos AGS establecidos en la población, 18 aislamientos representativos de 13 de estos grupos fueron evaluados en estudios de morfología en medio de cultivo artificial PDA y de patogenicidad sobre cinco cultivares de arroz en invernadero. El resultado fue la conformación de dos grandes grupos de aislamientos: Un primer grupo constituido por 6 aislamientos con morfología típica *R. solani* (grupos AGS #8, 9 y 10) que reprodujeron la enfermedad del añublo de la vaina en los estudios de patogenicidad bajo invernadero; y un segundo grupo constituido por los

restantes 8 aislamientos; estos mostraron diversas morfologías atípicas a *R. solani* y fueron no tuvieron la capacidad enfermar ni de reproducir los síntomas de la enfermedad en invernadero.



## INTRODUCCION

El añublo de la vaina del arroz es la segunda enfermedad más importante del cultivo de arroz en todo el mundo y es causada por el grupo de anastomosis AG1-IA del complejo de hongos *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) del genero *Rhizoctonia*. Este complejo está constituido por un amplio número de especies coexistentes en campo que comparten características de crecimiento y sintomatología en la planta muy similares a las del agente causal del Añublo de la vaina, lo que dificulta la clasificación taxonómica e identificación en el campo del patógeno, afectando así el adecuado entendimiento de la epidemiología, sintomatología y control de la enfermedad. La caracterización de la estructura genética, la patogenicidad y la revisión morfológica de las poblaciones de hongos asociados en campo a síntomas del añublo de la vaina del arroz en Colombia, permitirá establecer cuales especies de *Rhizoctonia* u otros hongos coexisten con *R. solani* AG1-IA, y esclarecer la verdadera relación planta: patógeno que existe entre el arroz y cada especie o variantes de hongos en el campo.

Este proyecto busca caracterizar molecularmente la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en campos de Colombia aplicando marcadores moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando primers prediseñados a partir de secuencias de ADN ribosomal especie específicas para la identificación molecular de las especies de hongos *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia oryzae* y *Rhizocotnia orizae-sativae*; y usando también la técnica de Polimorfismos de ADN Amplificados arbitrariamente (RAPD) con un primers híper variable usado exitosamente por otros estudios en especies de *Rhizoctonia ssp.* También se realizara un estudio de restricción con cinco enzimas endonucleasas en los productos de PCR de las secuencias Espaciadoras de Transcrito Intergénico de los genes rDNA ribosomal ITS. Finalmente se hará un estudio de patogenicidad y revisión morfológica de aislamientos representativos de la variabilidad genética molecular que se encuentre en los estudios moleculares de la población.

## 1. REVISION DE LITERATURA

El arroz es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, aunque es el más importante del mundo si se considera la extensión de la superficie en que se cultiva y la cantidad de gente que depende de su cosecha. A nivel mundial, el arroz ocupa el segundo lugar después del trigo si se considera la superficie cosechada, pero si se considera su importancia como cultivo alimenticio proporciona más calorías por hectárea que cualquier otro cultivo de cereales. Además de su importancia como alimento, el arroz proporciona empleo al mayor sector de la población rural de la gran parte de Asia (es el cereal típico del Asia meridional y oriental) y es amplia e intensamente sembrado en África, América y regiones de Europa meridional (mediterráneo).

El arroz (*Oryza sativae* L) es una monocotiledónea perteneciente a la familia *Poaceae*. Es originario de Asia tropical, se ha esparcido desde la latitud 40° sur a 44° norte y crece desde el nivel del mar, hasta 2.500 metros sobre el nivel del mar. Generalmente se cultiva bajo condiciones de riego aunque también en áreas húmedas de bastante precipitación (NAS, 1972). Las especies cultivadas son *Oryza glaberrima* y *O. sativae*. *Oryza sativae* se divide en las subespecies Indica y Japónica (Glaszman, 1987), aunque para algunos autores existe una tercera llamada javánica. Las javánicas se confinan principalmente a Indonesia, las japónicas generalmente a zonas templadas y las indicas a través de todos los trópicos del mundo, siendo representadas por miles de variedades desarrolladas bajo condiciones de crecimiento muy diversas (NAS, 1972).

### 1.1 GENERALIDADES DEL ARROZ

La producción de arroz se desarrolla bajo los sistemas de cultivo de inundación, secano, riego y secano favorecido (Pingali *et al*, 1991). China e India son los principales productores del cultivo, generando el 33 y 20% de la producción mundial del grano respectivamente. En América Latina se produce solo el 3.6% del arroz mundial en un área aproximada de nueve millones de hectáreas (Sanint y Wood, 1998). En Colombia la producción para el año 2004 fue de 2.521.300 toneladas de arroz paddy seco (6,96% más que en 2003) y fueron sembradas en 494.531 hectáreas de arroz en 2004, siendo Tolima y Casanare los departamentos con una mayor área sembrada -106.117 hectáreas (21,46%) y 103.743 hectáreas (20,98%), respectivamente DNP, 2007).

Históricamente el principal incremento en la producción de arroz mundial se inició alrededor de 1966 con la adopción de tecnología y variedades mejoradas genéticamente que lograban mayores rendimientos. Este fenómeno fue conocido como la revolución verde y fue aplicado a los principales cereales de la dieta humana (arroz, trigo y maíz) como “respuesta a la creciente amenaza alimenticia” que se cernía sobre África, Asia y América Latina, debido a la aceleración de la tasa de crecimiento de la población provocada por los modernos avances de la medicina y del cuidado de la salud. Antes de la revolución verde las variedades de trigo y arroz cultivadas eran altas y frondosas, con tallos débiles y con un índice de cosecha de 0,3. Su respuesta a las altas dosis de nitrógeno resultaba en un menor rendimiento por el volcamiento de las plantas. El incremento del rendimiento se obtuvo mejorando el índice de cosecha y la respuesta al nitrógeno incrementando la resistencia al volcamiento, lo cual pudo lograrse al disminuir la altura de la planta mediante la introducción del gen del “enanismo” (el gen recesivo *sd1*) procedente de la variedad china *Dee-geo-woo-gen*. Este gen permite que la planta invierta más recursos en el desarrollo del grano y menos en la producción de estructuras de la planta (paja), aumentando de este modo el índice de cosecha a más del 60%. Estas variedades enanas también tenían la combinación de otros rasgos deseables tales como alto macollamiento, hojas verde oscuro y erectas para mejor uso de la energía solar, así como tallos robustos. Los tallos robustos y la corta estatura produjeron una respuesta más alta a la fertilización nitrogenada, de modo que con la aplicación de fertilizantes, el potencial de rendimiento fue doblado a aproximadamente 9 toneladas por hectárea, constituyéndose en una importante ruptura en la historia del mejoramiento de cultivos. Con la liberación de las primeras variedades modernas mejoradas alrededor del año 1966, la producción de arroz se duplicó y solo se incrementó un 20% del área cultivada. En cuanto a los costos unitarios de producción, las variedades modernas de arroz de alto rendimiento son de un 20 a 30% más bajas que las variedades tradicionales y el precio actual (ajustado por inflación) es 40% más bajo que a mediados de los años 1960's.

En términos de variabilidad genética la revolución verde hizo que un relativo pequeño número de variedades de arroz reemplazara literalmente a cientos de variedades tradicionales, reduciendo así la diversidad o base genética del cultivo (Khush, 1977). La reducción de la base genética, y las prácticas de manejo del cultivo adoptadas por los cultivadores incrementó la incidencia de enfermedades y de número de insectos.

Después de la revolución verde la estrategia de mejoramiento del cultivo consistió en mantener el núcleo base de los materiales de porte bajo y tallo robusto (derivados del cultivar IR8) y adicionar solo algunos genes

específicos necesarios para controlar insectos y enfermedades que se fueran presentando, consolidando así la uniformización de la base génica del arroz (Cuevas-Pérez y otros, 1992). La uniformización de la base genética limita a largo plazo el techo de producción de los cultivos, así como la introducción de riesgos en la producción al disminuir su elasticidad ante el estrés ambiental y al aumentar su vulnerabilidad a pestes. La vulnerabilidad de los cultivos a las pestes puede causar catástrofes genéticas, como sucedió con la epífita del tizón sureño de la hoja de maíz, cuya susceptibilidad se encuentra asociada con el tipo de citoplasma T de maíz (NAS, 1972). En arroz no ha habido una asociación entre el definido rasgo del enanismo y genes de resistencia y/o susceptibilidad a insectos o enfermedades mayores del arroz (NAS, 1972) que supongan un riesgo similar al de la epífita del tizón sureño de la hoja de maíz.

En el mundo existe una gran preocupación en torno al incremento de la incidencia de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz ya que antes de la revolución verde, esta enfermedad ni siquiera se contaba entre las principales enfermedades del cultivo en no menos de 17 años. Hoy en día la enfermedad del añublo del arroz es la segunda limitante del cultivo para Colombia, Venezuela y Japón (Correa-Victoria, 1992; Iwasawa, 1987), mientras que en el Sur de los Estados Unidos es la principal (Marchetti, 1983). A pesar de no haber una asociación directa entre el gen del enanismo y la enfermedad del añublo de la vaina del arroz, el incremento de la incidencia de la enfermedad si está favorecida por el uso actual de plantas de bajo porte y los hábitos de manejo moderno del cultivo como la alta intensidad de explotación, el amplio uso de variedades tempranas o semi-tempranas, el aumento en el uso de fertilizantes nitrogenados y las altas densidades de siembra que elevan la humedad y temperatura a condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad.

La alta incidencia de enfermedades en el cultivo del arroz es uno de los factores que afecta la estabilidad del rendimiento del cultivo; por ello programas de mejoramiento de arroz en Colombia trabajan en el desarrollo de materiales con resistencia a las principales enfermedades e insectos y en asegurar que las prácticas de manejo cultural del cultivo sean la óptimas para minimizar la incidencia de dichas enfermedades (Correa-Victoria, 1997). Nuevas prácticas de manejo del cultivo desarrolladas por el Fondo Latinoamericano para el Arroz de Riego (FLAR) en el presente año disminuyen las dosis de nitrógeno y densidades de siembra incrementando el rendimiento del cultivo y disminuyendo a su vez las condiciones de alta temperatura y humedad que favorecen el desarrollo de la enfermedad del añublo de la vaina.

## **1.2 GENERALIZADES DEL AÑUBLO DE LA VAÍNA DEL ARROZ**

**1.2.1 Importancia del añublo de la vaina del arroz.** El Añublo de la vaina del arroz es causado por el grupo de anastomosis AG1-IA del complejo de hongos *Rhizoctonia solani*. Este grupo de anastomosis fue descrito inicialmente en el sudeste de Japón a comienzos de siglo y viene siendo subsecuentemente reportado en la mayoría de regiones arroceras del mundo (Dasgupta, 1992), incluyendo el sur de los Estados Unidos (Marchetti, 1983) donde se ha establecido no solo en múltiples especies silvestres, sino también en especies comerciales como soya, y arroz (Stroube, 1954). En los últimos años esta enfermedad ha incrementado fuertemente su incidencia constituyéndose en la segunda limitante más importante del cultivo del arroz en todos los sitios del mundo donde crece el cultivo. El incremento de la incidencia se ha debido a factores propios de la explotación moderna del cultivo que favorecen el microclima para el desarrollo de la enfermedad tales como la rápida adopción de cultivares semi enanos de alto rendimiento, el incremento de la fertilización nitrogenada (Lee and Rush, 1983), el uso de soya en los programas de rotación de cultivos y aumento de la densidad de población, entre otras (Marchetti, 1983). A comienzos de los años 90 la enfermedad comenzó a tornarse importante en Colombia, constituyéndose en una preocupación real, produciendo reducciones del rendimiento hasta de un 50% en variedades como Oryzica 1. Las pérdidas económicas anuales han llegado a ser equivalentes a 3.800 millones de pesos (Correa-Victoria, 1992). En Venezuela la incidencia de la enfermedad se ha visto igualmente incrementada a niveles que son solo superados por *Pyricularia grisea*. En Japón el añublo de la vaina es la segunda enfermedad del Arroz después de la *Pyricularia*; representa el 49.4% de un área de 2.13 millones has, las que fueron tratadas con fungicidas a un costo elevado (Iwasawa, 1987). En el sur de los estados unidos ésta enfermedad es endémica y es la mayor limitante del cultivo de Arroz, causando grandes pérdidas anuales (Marchetti, 1983). La ausencia de fuentes de resistencia conocidas, ha motivado la realización de estudios tendientes a buscar fuentes de resistencia para el patógeno en América Latina, indagando en cultivares de arroz colombianos, especies silvestres de arroz, fuentes de resistencia reportadas de ASIA y Estados Unidos y líneas avanzadas de mejoramiento del proyecto de arroz. (CIAT, 2000).

**1.2.2 Agente causal de la enfermedad.** El patógeno *Rhizoctonia solani* AG1-IA, causante de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz, hace parte del genero de hongos *Rhizoctonia*. Este género es ampliamente distribuido por todo el mundo, tanto en suelos cultivados como no cultivados. Las especies de *Rhizoctonia* son tan variadas que difieren en

patogenicidad y morfología, características culturales, fisiológicas y ecológicamente pueden ser patógenos en muchos hospederos, saprofitos en el suelo, o micorrizas de plantas orquidáceas (Ogoshi, 1987).

El añublo de la vaina del arroz hace parte de un complejo de enfermedades de la vaina en la que participan tres especies del género *Rhizoctonia*: *R. solani* Kühn, *R. oryzae* y *R. oryzae-sativae* (teleomorfos *Tanatephorus cucumeris*, *Waitea circinata* y *Ceratobasidium oryzae-sativae* respectivamente) (Johanson *et al.*, 1998). El añublo de la vaina es causada específicamente por la subespecie o subgrupo (AG1-IA) del complejo *Rhizoctonia solani*, la cual posee numerosas cepas que causan también enfermedades en un amplio número de otras especies de plantas (Tabla 1) (Carling, 1996).

Algunos autores conciben a *Rhizoctonia solani* como una especie colectiva (Pascual *et al.*, 2000), como un complejo de hongos (Cubeta and Vilgalys, 1997) o como una especie conformada por variantes internas genéticamente separadas (Carling *et al.*, 2001). El hongo *Rhizoctonia solani* es conocido también por el género llamado *Moniliopsis*. (Moore, 1987).

De lesiones similares a las de las del añublo de la vaina pueden llegar a obtenerse no solo diferentes cepas de hongos que pueden ser Basidiomicetos, Ascomicetos, Deuteromicetos si no también diferentes cepas de *R. solani* con características hifales semejantes (Parmeter, 1967), las que en su mayoría presentan diferencias en las características de crecimiento *in vitro* y en patogenicidad (Carling, 1996).

Tabla 1. Diferentes hospederos del patógeno *Rhizoctonia solani* establecidos en diferentes lugares del mundo.

Grupo de anastomosis	Fuente u hospedero	Sitio de colecta	Fuente bibliográfica
<i>R. solani</i> AG1	Desconocido	Java	
<i>R. solani</i> AG1 IA	Arroz	Japón	Matsumoto <i>et al.</i> , J. Fac. Agr., Kyushu Univ., (1996) 41(1*2) 39-44
<i>R. solani</i> AG1 IA	Arroz Minze	Texas	Liu and Zinclair, Canadian Journal Plant Pathology. (1993) 15: 272-280
<i>R. solani</i> AG1 IA	Arroz	Japón, Texas.	Liu and Zinclair, Canadian Journal Plant Pathology. (1993) 15: 272-280
<i>R. solani</i> AG1 IA	Arroz	Mindanao, Filipinas	Pascual <i>et al.</i> , Plant pathology (2000) 49, 108-118.
<i>R. solani</i> AG1 IA	Mungbean	Luzón, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Maíz	Luzon, Filipinas	"
		Mindanao,	
		Japón	
<i>R. solani</i> AG1 IA	Trigo	Mindanao, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Algodón	Luzon, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Itchgrass	Mindanao, Filipinas	"
	( <i>Rotthoeilia exaltata</i> )		
<i>R. solani</i> AG1 IA	Caña de Azúcar	Mindanao, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Sorgo	Mindanao, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Coupea	Mindanao, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Cogon	Mindanao, Filipinas	"
	( <i>Imperata cilindrica</i> )		
<i>R. solani</i> AG1 IA	Café	Mindanao, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Broadleaf Weed	Mindanao, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Grass weed	Mindanao, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	Blue grass	Mindanao, Filipinas	"
<i>R. solani</i> AG1 IA	<i>Lolium perenne</i>	Japón	Priyatmojo <i>et al.</i> , Phytopathology (2001) 91 (11), 1055-1061
<i>R. solani</i> AG1 IB	Arroz	Japón	Priyatmojo <i>et al.</i> , Phytopathology (2001) 91 (11), 1055-1061
<i>R. solani</i> AG1 IB	Remolacha	Japón	Liu and Zinclair, Canadian Journal Plant Pathology. (1993) 15: 272-280
<i>R. solani</i> AG1 IB	Soya	Japón/ Texas/Louisiana	Liu and Zinclair, Canadian Journal Plant Pathology. (1993) 15: 272-280
<i>R. solani</i> AG1 IB	Poa	Texas, USA	"
<i>R. solani</i> AG1 IB	Suelo	Pensylvania, USA	"
<i>R. solani</i> AG1 IB	Weed	Japón	Pascual <i>et al.</i> , Plant pathology (2000) 49, 108-118.
<i>R. solani</i> AG1 IB	Cauliflower	USA	Pascual <i>et al.</i> , Plant pathology (2000) 49, 108-118.
<i>R. solani</i> AG1 IB	<i>Agristis palustris</i>	Japón	Priyatmojo <i>et al.</i> , Phytopathology (2001) 91 (11), 1055-1061
<i>R. solani</i> AG1 IB	<i>Pyrus comunis</i>	Japón	Priyatmojo <i>et al.</i> , Phytopathology (2001) 91 (11), 1055-1061
<i>R. solani</i> AG1 IB	<i>Orchard grasss</i>	Tochigi Japón	Toda <i>et al.</i> , Micobiol. Res. (1999) 154: 247-258.
<i>R. solani</i> AG1 IB	Arroz	California	Liu and Zinclair, Canadian Journal Plant Pathology. (1993) 15: 272-280
<i>R. solani</i> AG1 IC	Remolacha	Japón	Liu and Zinclair, Canadian Journal Plant Pathology. (1993) 15: 272
		Minesota, USA	
		N. Dakota, USA	
<i>R. solani</i> AG1 IC	Buckwheat	Japón	Liu and Zinclair, Canadian Journal Plant Pathology. (1993) 15: 272
<i>R. solani</i> AG1 IC	Pino	Canada	"
<i>R. solani</i> AG1 IC	Lima bean	New York, USA	"
<i>R. solani</i> AG1 IC	Spurce	California	"
<i>R. solani</i> AG1 IC	Buckwheat	Japón	Pascual <i>et al.</i> , Plant pathology (2000) 49, 108-118.
<i>R. solani</i> AG1 IC	<i>Brassica olerasea</i>	USA	Priyatmojo <i>et al.</i> , Phytopathology (2001) 91 (11), 1055-1061
<i>R. solani</i> AG1 IC	<i>Beta vulgaris</i>	Japón	"
<i>R. solani</i> AG1 ID	<i>Coffea arabica</i>	Filipinas	Priyatmojo <i>et al.</i> , Phytopathology (2001) 91 (11), 1055-1061
	<i>Necrotic leaf spot</i> )		
<i>R. solani</i> AG2-1	Pea	Japón	Lubeck and Poulsen, FEMS Microbiology Letter 2001. 201: 83-89.
<i>R. solani</i> AG2-2t	Tulipan	Holanda	Lubeck and Poulsen, FEMS Microbiology Letter 2001. 201: 83-89.
<i>R. solani</i> AG2-2 IIIB	Mat rush	Japón	Matsumoto <i>et al.</i> , J. Fac. Agr., Kyushu Univ., (1996) 41(1*2) 39-44
<i>R. solani</i> AG2-2 IIIB	Arroz	Japón	"
<i>R. solani</i> AGWAG-0	Arroz	Japón	"
<i>R. fumigata</i> AGBa	Arroz	Japón	"
<i>R. oryzae-sativae</i> AGBb	Arroz	Japón	"
<i>R. solani</i> AG1 IC	Lima bean	New York, USA	"

**1.2.3 Clasificación de las especies del genero *Rhizoctonia*.** El estudio y la identificación de las especies de *Rhizoctonia* siempre han representado un reto a causa de su taxonomía indefinida y al pobre entendimiento que se tiene de su historia natural. Los estudios de genética y biología poblacional de *Rhizoctonia* se han vuelto confusos debido al creciente conocimiento que se tiene de que *Rhizoctonia solani* es realmente un gran complejo de especies compuesto de muchos grupos genéticamente distintos con historias de vida muy diversas (Cubeta and Vilgalys, 1997). La clasificación de algunas especies del género *Rhizoctonia*, al igual que subespecies de *Rhizoctonia solani*, ofrecen dificultades en su clasificación debido a la alta similaridad en la producción de síntomas en la planta y en sus formas de crecimiento en campo y laboratorio (Johanson *et al.*, 1998).

Para la clasificación de los aislamientos del género *Rhizoctonia* existen dos conceptos prácticos importantes, que son el número de núcleos y los agrupamientos de estos por sus afinidades de anastomosis. (Kronland and Stanghellini, 1988). Para Cubeta y Vilgalys (1997) la clasificación de los aislamientos de *Rhizoctonia* mediante los grupos de anastomosis, representa el avance individual más importante en el entendimiento de la diversidad genética dentro de *Rhizoctonia*.

**1.2.4 Complejo *Rhizoctonia solani* y su caracterización.** Desde que en 1815 Candolle describiera por primera vez el género *Rhizoctonia*, más de un centenar de especies han sido descritas. Estas especies son distinguidas unas de otras primariamente en lo concerniente a la morfología y dimensión de esclerocios y células monilioides y en la base de su patogenicidad. Sin embargo las características del genero *Rhizoctonia* son vagas y de ello han surgido algunas diferencias entre los investigadores en cuanto al reconocimiento de este género. *Rhizoctonia* es considerado (Ogoshi, 1987) un genero de hongo basidiomiceto imperfecto caracterizado (según Ogoshi, 1975) por a) ramificación cercana al septo discal en células jóvenes, hifa vegetativa; b) formación de un septo en la rama cerca al punto de origen; c) constricción de la rama; d) Septo doliporo; e) No conexión en grapa; f) no conidios, excepto en células monilioides; Esclerocio no diferenciado dentro de corteza y médula y no rhizomorfos. En estos términos, de las cien especies reportadas, solo 45 son verdaderas *Rhizoctonia*, once no lo son y 44 son dudosos (Ogoshi, A. 1984). Adicionalmente algunas especies previamente reportadas como *Sclerotium* y otros géneros hasta 1987 se consideraron *Rhizoctonia* (Ogoshi, 1984).

El surgimiento de nuevas metodologías basadas en técnicas moleculares ha permitido hacer nuevas clasificaciones del hongo, reevaluar y/o



confirmar las clasificaciones hechas con base en los grupos de anastomosis (Rosewich *et al.*, 1999). Estudios de RFLP's con ADN Ribosomal y RNA - RNA indican una relación divergente entre los aislamientos de *R. solani* y no establece relaciones de subgrupos dentro del grupo de anastomosis AG-2. Para algunos autores los grupos de anastomosis son útiles pero no son la mejor manera de hacer clasificaciones de aislamientos de *R. solani* (Liu and Sinclair, 1992).

En la actualidad se dispone de marcadores moleculares basados en secuencias de genes de rDNA ribosomal que permiten el diagnóstico de las cepas de *Rhizoctonia solani* diferenciándolas de las de otras especies del mismo género (Matsumoto *et al.*, 1996; Johanson *et al.*, 1998). También es posible la identificación de los grupos de anastomosis dentro del complejo *Rhizoctonia solani* (Lubet and Poulsen, 2001) y caracterización de la diversidad genética (Liu and Sinclair, 1993).

Metodologías como RAPD's (Duncan *et al.*, 1993), y cariotipo por electroforesis (Keijer *et al.*, 1996) han sido usadas para la agrupación de *R. solani* en subgrupos genéticamente distintivos (Toda *et al.*, 1999).

**1.2.4.1 Condición nuclear de células vegetativas.** Una característica que es consistente con todas las cepas de *R. solani* y que distingue a estas de la mayoría de las otras especies de *Rhizoctonia* es la condición nuclear de las células vegetativas. Todos los aislamientos de *R. solani* son multinucleados y son considerados como el estado imperfecto de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Kronland and Stanghellini, 1988). *R. zeae* Voorhees también es una especie multi nucleada, pero puede ser distinguida de *R. solani* por diferencias en la morfología esclerotial. Otros hongos similares a *Rhizoctonia* son binucleados y muchos de estos provienen del género *Cerotobasidium* Roberts (Parmeter *et al.*, 1967).

**1.2.4.2 Grupos de Anastomosis (GA).** El concepto de grupo de anastomosis (GA) de *Rhizoctonia solani* Kühn es un concepto importante en el estudio de ésta especie. El agrupamiento por GAs de *R. solani* es basado en la anastomosis hifal (Fusión de hifas) con aislamientos probadores de cada GA. Los aislamientos de *R. solani* que realizan anastomosis con un aislamiento probador de GA, son asignados al mismo grupo de anastomosis; mientras que aislamientos de distintos grupos de anastomosis generalmente no producen reacción de anastomosis con cada uno de los otros aislamientos probadores de GA (Carling, 1996).

La significancia del concepto de Grupos de Anastomosis es que cada uno de estos grupos puede ser considerado como una población separada, sin entre cruzamientos (Anderson, 1982). En adición los aislamientos de cada uno de los GA difieren un poco en el rango de hospederos y hábitos de patogenicidad respecto a otros GA (Parmeter *et al.*, 1969) (Tabla 1). Por ejemplo el añublo de la vaina del arroz es causado por aislamientos procedentes del grupo de anastomosis GA-1, mientras que aislamientos del GA-3 son encontrados principalmente en tomate (Anderson, 1982). La determinación de los grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* se ha constituido en un paso importante en el estudio de la especificidad de cepas de hongos involucradas en enfermedades particulares (Kronland and Stanghellini, 1988). Estudios de patogenicidad, morfología y biología molecular, han mostrado que los subgrupos y grupos establecidos por anastomosis (grupos AG's) son genéticamente aislados y representan unidades evolutivas altamente divergentes (Laroche *et al.*, 1992; Kuninaga and Yokosawa, 1982).

Los métodos para la determinación de grupos de anastomosis en aislamientos de *Rhizoctonia* han sido ampliamente reportados; estos se basan en observaciones directas al microscopio de hifas teñidas que han sido previamente crecidas en láminas de medio agar-agua al 2% (Parmeter *et al.*, 1969), algunas son crecidas en medio Papa Dextrosa Agar (Castro *et al.*, 1983) y otros han usado colorantes fluorescentes bajo excitación con luz ultravioleta, como "Acridina orange" y "DAPI" (4',6'-diamino -2-phenylindole) (Anderson, 1982). Kronland and Stanghellini, (1988) propusieron un método que reduce el tiempo y el uso de equipos sofisticados.

El uso del concepto de grupo de anastomosis permite la formación de grupos de aislamientos de *R. solani* que juntos son más homogéneos que la especie misma como un todo. Sin embargo muchos grupos de anastomosis similares a *R. solani* misma, contienen aislamientos que varían de uno a otro en términos de virulencia, morfología de la colonia y otras características. GA-1, -2, -3, -4, -6, -6, -7, -8 y 9 todos tienen subgrupos GA y sub-subgrupos GA identificados con base en características que incluyen morfología, virulencia, rango de hospederos, requerimientos nutricionales, características bioquímicas y secuencias de ADN Carling *et al* (2001). Subgrupos de un GA identificado con base en uno o más de estos criterios no siempre son idénticos a subgrupos identificados con base en otros criterios. Por consiguiente el reconocimiento de subgrupos de un GA y los miembros de cada uno de los subgrupos depende del criterio o combinación de criterios usados para la caracterización (Carling *et al* 2001).

**1.2.4.3 Genes de RNA ribosomales.** Los grupos de genes de RNA ribosomal están ubicados tanto en el ADN nuclear como en el mitocondrial, y están constituidos por regiones altamente conservadas y regiones variables que incluyen los genes para las sub unidades rRNA pequeñas 5.8S y las sub unidades rRNA grandes (White *et al.*, 1990). Los genes rDNA nucleares de los hongos están arreglados en repeticiones *en tándem* con cientos de copias por genomas. Las secuencias conservadas establecidas en la sub unidad larga de los genes (en inglés LSU) y en la sub unidad pequeña (en inglés SSU) vienen siendo explotadas para muchas de las relaciones entre hongos distantemente relacionados (Bridge and Arora, 1998). La región espaciadora entre las sub unidades llamada espaciador de transcrito Inter. Génico (en inglés ITS), y la región espaciadora entre los clúster de genes llamada espaciador Inter génico (en inglés IGS) son considerablemente más variables que las secuencias de las sub unidades, y vienen siendo ampliamente usados en estudios de relación entre especies dentro de un género, o entre poblaciones intra específicas (Bunchko and Klassen, 1990; Lee and Taylor 1992). Las secuencias ITS consisten de dos regiones no codificantes variables que están ubicados dentro de las secuencias repetidas rDNA, entre la pequeña sub unidad 5.8S altamente conservada y la sub unidad larga. Los ITS son usados ampliamente para estudios de caracterización molecular en hongos por cuatro razones principales (Bridge and Arora, 1998): i) La región ITS es relativamente corta (500-800 pb) y puede ser fácilmente amplificadas por PCR usando una pareja simple de primers universales que son complementarios a las regiones conservadas dentro de la sub unidad rRNA de los genes (White *et al.*, 1990). ii) La naturaleza multicopia de las secuencias repetidas rDNA hace las secuencias ITS fáciles de amplificar a partir de muestras de ADN diluidas, pequeña o altamente degradadas (Gardes and Burns, 1993). iii) Las secuencias ITS pueden ser altamente variables entre especies morfológicamente distintas (Gardes *et al.*, 1991, Lee and Taylor, 1992) y así los datos generados mediante RFLP's de las regiones ITS pueden ser usados para estimar distancias genéticas y proporcionar caracteres para análisis de sistemática y filogenia (Burns *et al.*, 1991); iv) las sondas ITS específicas de especie generadas vía PCR pueden ser rápidamente producidas sin la necesidad de producir una librería cromosomal (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996) y porque muchos investigadores han secuenciado regiones ITS para desarrollar sondas especie-específicas debido a que las secuencias existen en copias múltiples y tienden a ser similares dentro y entre especies variables de hongos.

**1.2.4.4 Familias de secuencias ERIC y REPs.** Son familias de pequeñas secuencias intergénicas repetidas palindromicas invertidas altamente conservadas que han sido reportadas primeramente en enterobacterias;

estas se dividen en dos clases: secuencia repetitiva palindrómica extragénica (en inglés Repetitive Extragenic Palindromic, REP) y la secuencia enterobacterial intergénica repetitiva consenso (en inglés Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, ERIC) (Stern *et al.*, 1984). Estas secuencias fueron usadas para diseñar primers (“Primers motif”) específicos de cepa y de especie en para eubacterias (Versalovich *et al.*, 1991) y *Rhizobiaceae* (De Bruijn, 1992). Estudios de Toda *et al* (1999) usando “primers motif” de las secuencias ERIC en aislamientos de *R. solani*, lograron reproducir la clasificación de los grupos de anastomosis a los que pertenecían (11 GAs) y distinguir además, variaciones genéticas existentes al interior de algunos de los grupos, indicando estas secuencias son útiles para los estudios de clasificación de *R. solani*.

**1.2.5 Relaciones ínter específicas en el género *Rhizoctonia*.** Las especies *R. oryzae* y *R. oryzae-sativae*, que junto a *R. solani* forman parte del género *Rhizoctonia*, causan respectivamente las enfermedades manchas de la vaina y manchas agregadas de la vaina, las cuales a pesar de no ser tan importantes como *R. solani*, vienen siendo reportadas en Arroz en regiones donde frecuentemente se presenta el Añublo de la vaina del Arroz (Johanson *et al.*, 1998). Estas dos especies causan lesiones en la vaina muy similares a las del Añublo de la vaina, haciendo que el diagnóstico de estas enfermedades visualmente sea muy difícil y a veces impreciso, particularmente en los estados tempranos de desarrollo de la lesión cuando las medidas apropiadas para el manejo de la enfermedad deben ser tomadas. La precisión en la distinción de estos patógenos es esencial para lograr un éxito en los programas extensivos de mejoramiento a lo largo de Asia (Johanson *et al.*, 1998). La distinción de las tres especies con base al crecimiento en medio de cultivo también es difícil debido a la carencia de caracteres morfológicos estables en los cuales basar una clasificación definitiva del género *Rhizoctonia* y las especies asignadas a este (Johanson *et al.*, 1998). Johanson *et al* (1998) desarrollaron a partir de secuenciación de las regiones 5.8S de los genes rDNA ribosomal de las especies *R. solani*, *R. oryzae* y *R. oryzae-sativae* primers específicos de especie.

**1.2.6 Relaciones intra específicas en el complejo *R. solani*.** Para determinar las relaciones de afinidad entre las cepas de *R. solani* y hacer su clasificación, se han evaluado varios criterios que incluyen la sexualidad, número de núcleos (Cedeño *et al.*, 1995) y capacidad de anastomosis (fusión mecánica de hifas). En virtud de la variación patogénica de *R. solani* y otros saprofitos, la caracterización sexual de estos hongos se presenta como el criterio taxonómico más confiable para

su diferenciación (Mordue *et al.*, 1989); sin embargo, esta se dificulta porque la aparición del estado sexual es raro y difícil de inducir en laboratorio.

**1.2.6.1 Clasificación de cepas de *Rhizoctonia* mediante grupos de anastomosis.** El criterio de grupos de anastomosis ha sido el único criterio práctico y el que ha permitido clasificar las cepas del hongo *R. solani* en grupos. Hasta 1996 se habían establecido 14 grupos (Carling, 1996). El grupo de anastomosis AG1, al que pertenecen las cepas de *Rhizoctonia solani* que causan el Añublo de la vaina del Arroz se dividen en cuatro subgrupos, de los cuales AG1-IA, AGIIB y AG-I-IC son causantes de la quema foliar en huéspedes distintos incluyendo arroz, maíz, sorgo y soya (Jones and Belmar., 1989). Para los patólogos experimentados la determinación del patógeno en la práctica no representa ningún problema, pues solo con tomar micelio de lesiones típicas del Añublo de la vaina se obtiene la cepa del hongo *R. solani* AG1-IA. El problema de identidad del patógeno se presenta solo cuando se hace muestreo de esclerocios y no de micelio de las lesiones típicas (Correa-Victoria, comunicación personal)

**1.2.6.2 Desventajas de la clasificación de *Rhizoctonia* mediante Grupos de anastomosis.** A pesar de la utilidad práctica y comprobada de la clasificación de las cepas de *R. solani* mediante los grupos de anastomosis, esta metodología presenta limitaciones que complican la identificación de los GAs (Toda *et al.*, 1999) debido a factores como pérdida de la habilidad de anastomosis en algunos aislamientos y la ocurrencia de anastomosis entre aislamientos pertenecientes a grupos de anastomosis diferente (Kuninaga & Yokosawa, 1979; Neate *et al.*, 1988). Malas clasificaciones con los GA ocurren debido a la incidencia de una variada frecuencia de fusión de hifas (Liu and Sinclair, 1992; Toda *et al.*, 1999), por lo que muchas poblaciones son dejadas sin clasificar. Las hifas de uno de los grupos de anastomosis AG-2 (distintos a los causantes del Añublo de la vaina, el grupo AG1-IA) se fusionan también con hifas de los grupos AG8 o AGBI. En conclusión el sistema de clasificación por anastomosis requiere de verificación y clarificación. (Liu and Sinclair, 1992). Toda *et al* (1999) concluyen que el método de clasificación por grupos de anastomosis es útil para *R. solani*, pero no el ideal; y que además no ofrece información fidedigna en cuanto a la variación genética o las relaciones taxonómicas dentro y entre los grupos de anastomosis (Toda *et al* 1999).

**1.2.7 Identificación de especies del genero *Rhizoctonia* usando genes de RNA ribosomal.** Matsumoto y colaboradores en 1996 mediante estudios

con RFLP's de productos de PCR de la región del hongo homologa a las posiciones 17-1 448 de la región 25 S rDNA de *S. cerevisiae* (Vilgalys and Hesler, 1990), lograron establecer una metodología para la identificación de cinco especies del género *Rhizoctonia*, tres de ellas multinucleadas: *Rhizoctonia solani* AG1-IA, *R. solani* AG2-2 IIIB, *R. oryzae* WAG-0, y dos binucleadas: *R. fumigata* AGB-a y *R. oryzae sativae*AGBb. Por otra parte en 1998 Johanson y colaboradores (1998) desarrollaron una metodología para discriminar o identificar tres especies de *Rhizoctonia*: *R. oryzae-sativae*, *R. solani* y *R. oryzae*, Estos estudios consistieron en la amplificación y posterior secuenciación de los productos de PCR de las regiones ITS (intergenic transcribed spacer) de las tres especies de *Rhizoctonia* usando los primers universales ITS-1 e ITS-4. Posteriormente se identificaron las regiones específicas de especie y se diseñaron primers que permitieron la identificación específica de cada una de las especies mediante PCR.

**1.2.8 Identificación y caracterización de grupos de anastomosis del complejo *Rhizoctonia* usando genes de RNA ribosomal.** En el año 2001 Lubet, Poulsen usando primers universales lograron la obtención de perfiles de bandas del complejo *Rhizoctonia* que permitieron la identificación de los grupos de anastomosis del mismo. Pascual *et al* (2000) usando tres primers de RAPD lograron la clasificación de tres grupos de anastomosis del complejo *Rhizoctonia solani* obtenidos de maíz. Liu and Sinclair (1993) mediante RFLP's de productos de PCR amplificados con las combinaciones de primers ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4, caracterizaron la diversidad genética del grupo de anastomosis AG1, encontrando la existencia de seis grupos internos.

**1.2.9 Detección de sexualidad en *Rhizoctonia solani* usando marcadores RFLP's.** Usando marcadores moleculares neutrales tipo RFLP's de copia sencilla, que distinguen de manera precisa entre homocigotos y heterocigotos (Baverstock y Moritz, 1996); en 1999 Rosewich y colaboradores concluyeron que la población del patógeno *R. solani* AG1-IA, dispone de una amplia diversidad genética acoplada con efectivos mecanismos de migración-flujo de genes que parece exhibir una estructura de población epidémica; mientras que los nuevos genotipos son generados aparentemente por recombinación sexual. Una vez las combinaciones genéticas favorables son formadas, la selección actúa individualmente sobre los aislamientos y ellos se incrementan por reproducción asexual a altas frecuencias. La detección sexualidad en *R.solani* AG1-IA cambia las perspectivas de mejoramiento para el control

de la enfermedad mediante resistencia varietal que ofrecería un hongo de reproducción asexual.

### **1.3 SÍNTOMAS Y DIAGNOSTICO**

Generalmente el hongo ataca en la vaina y follaje; cuando el ambiente es favorable se extiende hacia arriba alcanzando las espigas. Inicialmente se presentan lesiones irreconocibles de color verde oscuro en la base de los tallos que adquieren luego forma elíptica típica, observándose la presencia de un borde oscuro y centro gris blanco. La lesión en la hoja es parecida a la lesión en la vaina, pero gran parte de la lesión es de tamaño grande y formas irregulares. Inicialmente la enfermedad se presenta en la parte de abajo en la vaina y/o en la hoja, luego se extiende hacia arriba. Cuando el ambiente es favorable, el patógeno continua su desarrollo, los micelios y las lesiones se agrandan, luego las vainas y las lesiones se secan, y los tallos se ablandan y se parten, ocurriendo volcamiento. Entre el tallo superior y el cuello de la panoja inicialmente se presentan las lesiones de color verde oscuro que se ve humedecido, luego el borde café oscuro, el centro verde grisáceo y mueren las espigas. En las lesiones viejas inicialmente se desarrollan masas blancas de micelios que se transforman en esclerocios, como una papa de tamaño entre 2 – 3 mm. Las masas de micelio se extienden hacia las plantas vecinas generando el desarrollo horizontal de la enfermedad. Cuando la enfermedad es más grave se ven los himeneos que son fungosos blancos fuera de las lesiones en las primeras horas de la mañana. Cuando la enfermedad alcanza la hoja bandera o más arriba, el rendimiento se pierde en más de un 30% (Iwasawa, 1987).

### **1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.**

La principal fuente de inóculo para el inicio de la epidemia son los esclerocios producidos sobre las lesiones causadas por el hongo que sobreviven en el suelo y en los residuos de cosecha. Los esclerocios son diseminados por el suelo al momento de la preparación para la siembra y posteriormente con el riego. Los esclerocios inician el desarrollo de la enfermedad al momento de entrar en contacto con los tallos de las plantas, extendiéndose la enfermedad hacia la parte superior de la planta; el desarrollo de la enfermedad puede ser vertical u horizontal, siendo esta última más rápida y más grave, sobre todo durante estación húmeda y en parcelas con contenido elevado de abonos nitrogenados (Correa-Victoria, 1992).

### **1.5 CICLO DE VIDA DEL PATÓGENO.**

La principal fuente de inóculo del patógeno es el esclerocio formado tanto en el cultivo anterior como en las malezas que lo rodean. Los esclerocios empiezan a formarse durante la etapa lechosa del grano siendo más abundantes en ataques severos. Los esclerocios sobreviven en el suelo y residuos de cosecha, y la mayoría aparecen durante la preparación del suelo, flotan en agua y se adhieren a los tallos de las plantas. En suelo seco los esclerocios pueden vivir 21 meses. Cuando el esclerocio flota este no germina; solo lo hace cuando la temperatura es mayor de 16 a 18 grados centígrados y la humedad superior a 95%. El esclerocio inicia la enfermedad luego de adherirse y germinar en la base de la vaina dando paso a la penetración. La penetración en el tejido de la planta de Arroz se da a más de 23 grados centígrados. Para unos autores la infección inicial es causada por estructuras de penetración que se encuentran en los cojines de infección. Sobre penetración Marshall y Rush (1980) afirman que es exclusivamente por presión mecánica y se realiza por la superficie externa; Matsura (1986) afirma que la penetración se realiza por la superficie interna y no tiene precisión acerca de la penetración enzimática. Aunque se observa penetración por estomas, esta es ineficiente y no implica la formación de cojines de infección. Estos dos autores afirman también que la severidad de la enfermedad está también determinada por la formación de cojines de infección, habilidad estimulada por el huésped y que constituye una medida de la agresividad del patógeno hacia un huésped en particular. Posteriormente a que la infección alcance la hoja bandera y la panícula, se afecta el llenado de los granos y con ello el rendimiento. Las plantas de porte semienano son más susceptibles que las de mayor altura, ya que la distancia entre la superficie de la lámina de agua y el follaje es más corta. *Rhizoctonia solani* AG-1, posee un sistema de apareamiento primariamente heterotálico y una estructura poblacional de cruzamiento abierto (outcrossing) (Cubeta and Vilgalys 1997).

### **1.6 ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO DE LA ENFERMEDAD**

La clave del manejo de las enfermedades está en conocer la sintomatología y epidemiología del patógeno, las cuales permiten establecer labores económicas y efectivas para controlar la enfermedad y/o evitar su desarrollo. Dentro de la epidemiología el conocimiento de la estructura genética de la población de *Rhizoctonia solani* es de vital importancia para el control de la enfermedad; no solo desde el punto de vista de la resistencia varietal sino también del control químico. En India tres especies de *Rhizoctonia* de diagnostico difícil en el campo y a veces hasta



imposible, mostraron respuestas diferenciales al tratamiento con carbendazin, un fungicida de amplio espectro (Turner *et al*, 1999).

**1.6.1 Control cultural.** El incremento de la incidencia y severidad de la enfermedad ha sido causado por las prácticas de los mismos métodos de cultivo, principalmente las relacionadas con el uso de altas densidades de siembra, alta fertilización nitrogenada, uso de variedades de ciclo corto y susceptibles, porte bajo y un alto macollamiento. Estos factores además de las siembras tempranas coinciden o favorecen la temperatura y humedad relativa óptima para el desarrollo de la enfermedad. El manejo adecuado de los factores anteriores ayuda a disminuir los riesgos del desarrollo del Añublo de la vaina; sin embargo en los sitios donde ya se presenta la enfermedad afectando el rendimiento, es necesario adoptar estrategias que reduzcan la cantidad de inóculo primario y/o esclerocios en el suelo. La incidencia de la enfermedad está altamente correlacionada con la densidad del inóculo (número de esclerocios recuperados por unidad de suelo). En un campo fangado el número y viabilidad de esclerocios se reduce a mayor profundidad por efecto anaerobios y factores microbianos. La preparación superficial de suelo incrementa la incidencia de la enfermedad al mantener viables los esclerocios y facilitar su dispersión con el riego. La incidencia de la enfermedad se disminuye al hacer un arado (“volteo”) profundo, nivelación del suelo con fangado e inundación estática; otras recomendaciones hechas por FEDEARROZ para disminuir la fuente primaria de inóculo es la quema inmediata de residuos de cosecha y posterior incorporación a 20 o 30 cm. de profundidad (Correa-Victoria, 1992).

**1.6.2 Control biológico.** Algunas bacterias del suelo tales como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* ejercen control sobre el hongo *Rhizoctonia solani*, disminuyendo la viabilidad de los esclerocios del hongo. El hongo saprofito *Trichoderma harzianum* con habilidades para descomponer los restos de cosecha, afecta la supervivencia del hongo. Este último es el que más promete para el control biológico del hongo (Correa-Victoria, 1992).

**1.6.3 Control químico.** Ha sido la única solución al problema de la enfermedad del Añublo de la vaina, especialmente en Japón y toda Asia. El periodo de control químico se ejerce desde el estado de formación de la panícula hasta su emergencia. El desarrollo de lesiones en la parte superior de la planta es más serio que el mismo número de macollas afectadas. El tiempo más adecuado para el control químico es el tiempo de

desarrollo de las lesiones de la vaina en la cuarta hoja antes que se extienda hacia la tercera hoja, lo cual coincide con el quinto al quinceavo día antes de la floración. Este es el periodo más altamente asociado con pérdidas en un cultivo comercial (Correa-Victoria, 1992).

Como pesticida natural, estudios con extractos *Metanolicos* obtenidos de cianobacterias (específicamente la cepa ATCC 53789) mostraron tener un efecto antimicótico efectivo contra nueve especies de hongos incluidos *Rhizoctonia solani*, además de mostrar efectos insecticida, nematocida y citotóxico (Biondi *et al*, 2004).

#### **1.6.4 Resistencia Varietal.**

**1.6.4.1 Mecanismos de resistencia a patógenos en plantas.** Las plantas son explotadas por un gran número y variedad de organismos, desde una relación parasítica íntima a herbívoros accidentales. Las plantas han desarrollado un amplio rango de “mecanismos de defensa” que van desde el escape hasta sofisticados mecanismo de defensa. El escape es usado especialmente contra parásitos animales con habilidades sensoriales y se basa en la emisión de olores y/o sabor desagradable, pubescencia, espinas, y cutículas gruesas que entre otras características desanimen o dificulten su consumo a los parásitos. Los mecanismos de resistencia casi siempre son de naturaleza bioquímica y usados universalmente por todas las plantas contra casi todos los parásitos reduciendo su crecimiento. Contra patógenos como virus, bacterias y hongos la estrategia de resistencia es predominantemente de defensa. La tolerancia es otro mecanismo de defensa de las plantas y comparada con la resistencia es poco lo que se conoce acerca de su importancia y funcionamiento Parlevliet (1983).

Una de las estrategias de defensa más aceptada es la propuesta en la teoría de gen por gen (Flor, 1955) en la que un gen de resistencia específico de la planta interactúa directa o indirectamente con un gen de avirulencia en el patógeno (Lamb, 1989). Los genes de avirulencia son enzimas involucradas en la síntesis de sustancias determinantes que inician la respuesta de defensa, o ligandos que activan las respuestas de defensa en la planta; estos tienden a mutar rápidamente y no confieren ningún valor selectivo (Lamb, 1989). Algunos consideran que los genes de avirulencia confieren alguna ventaja al patógeno en hospederos susceptibles.

Los modelos propuestos para explicar la interacción entre el gen de avirulencia y el gen de resistencia incluyen el modelo receptor - efector, el modelo dímero y el de canal de iones, citados todos por Gabriel y Rolfe (1990). El modelo de receptor efector propone que genes de avirulencia

codifican por las enzimas glicosil transferasas que modifican glicoproteínas de la superficie celular en moléculas específicas reconocidas por receptores (genes de resistencia) en el hospedero, las cuales activan la respuesta de defensa generalizada en la planta, como la respuesta hipersensible. El modelo de dímero describe la unión entre los productos primarios de los genes de resistencia del hospedero y los genes de avirulencia del patógeno, en una interacción proteína – proteína, o también la unión de la proteína de uno de los dos genes y el gen o el transcrito ARN mensajero del otro. El modelo del canal de iones (Gabriel y Rolfe, 1990) propone que la transmisión de las señales se debe al flujo de electrolitos (calcio). Cuando hay disfunción del canal producida por la unión de la señal efectora, se produce la muerte directa de la célula sin la intervención de ningún otro gen. Las respuestas de la planta propiciadas por los mecanismos de defensa van desde el intercambio de iones de potasio, síntesis de fitoalexinas (Compuestos antimicrobianos), hipersensibilidad en el sitio de la infección, generación de sustancias oxidativas, inducción de proteínas quitinasas y glucanasas.

**1.6.4.2 Resistencia varietal al añublo de la vaina en el arroz.** Se consideran como las principales fuentes de resistencia al añublo de la vaina del arroz a los cultivares Ta-poo-choz y Tetep entre doce variedades, mientras que la especie *Oryza officinalis* ha sido reportada como una buena fuente de resistencia al Añublo (Correa-Victoria, 1992). Miles de líneas de Arroz han sido evaluadas por el International Rice Research Institute (IRRI) por su resistencia al patógeno *Rizoctonia solani*, sin encontrarse resistencia. En condiciones ambientales distintas a las del IRRI, muchos de los cultivares considerados como resistentes han resultado susceptibles. Estudios con 25 géneros de *Oryzae* no mostraron tener resistencia al patógeno. Hoy en día todas las variedades de Arroz que se cultivan en el mundo son susceptibles. Las variedades de tallos cortos y alto macollamiento son más afectadas porque aumentan la humedad dentro de los tallos y hay más tallos a los que fácilmente se adhieren los esclerocios. Algunas variedades sufren menos daños que otras cuando la enfermedad afecta en igual grado, siendo estas consideradas variedades resistentes al daño; este grado de diferencia en la infección es debido a condiciones físicas y morfológicas de la planta de Arroz.

Es posible que la ausencia de resistencia detectada en muchas variedades de Arroz en el campo pueda deberse entre otros factores ya mencionados, a que además de la presencia de la subespecie *R. solani* AG1-IA (causante del Añublo de la vaina del Arroz), exista de manera simultánea otra u otras especies del género que tengan morfología similar y causen enfermedades con síntomas similares y que estas sean asumidas como la enfermedad o como inicio de brotes de añublo de la vaina que sean controlados

químicamente como tal. Turner *et al* (1999) usando primers de PCR diagnosticadores de las especies *R. solani*, *R. orizae* y *R. oryzae-sativae*, detectaron la presencia simultánea de dos de tres especies de *Rhizoctonia* en diversos campos de Arroz en India; registrando incluso el ataque de más de dos especies por planta.

## 2. MATERIALES Y METODOS.

Este trabajo consistió en la caracterización molecular de la colección CIAT de hongos colombianos asociados en campo a síntomas del añublo de la vaina del arroz y en el estudio de la morfología y patogenicidad de aislamientos representativos de la variabilidad genética molecular de la población.

### 2.1 UBICACION

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología e invernaderos del proyecto de arroz del Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, sede Palmira, Valle (Colombia).

### 2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

**2.2.1 Población del hongo.** El presente estudio se realizó con los aislamientos de la colección CIAT de hongos colombianos asociados a síntomas en campo del añublo de la vaina del arroz, e incluyó principalmente hongos de *Rhizoctonia* spp, en especial recolectadas como *R. solani*. La colección se encontraba en el Laboratorio de Patología de Arroz del CIAT, en forma de esclerosios y/o micelio almacenado en papel filtro refrigerado a -20 °C. Se usaron 140 aislamientos (Tabla 2) que incluían dos cepas controles de *R. o. sativae*, dos de *R. solani* AG1-IA, seis cepas morfológicamente clasificadas como *Sclerotium*, cuatro esclerocios de suelo de campos infectados, un aislamiento de pasto Argentina, uno de *Brachiaria* spp. y 124 de micelio y/o esclerocios de lesiones de vainas y hojas 24 cultivares de arroz. La colección se extiende desde los años 1987 a 2004 y procede de cuatro regiones geográficas de Colombia (Tabla 3) en las que se cultiva el arroz: Zona Centro (Tolima, Huila), Occidente (Valle del Cauca), Oriente (Llanos – Meta, Llanos – Casanare) y Costa Atlántica.

**Tabla 2.** Listado de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia usados en este Estudio.

Código	# registro	Origen	Origen geográfico	Fecha de Colecta
001R	1700_02_M	Oryzica 3	Valle/Jamundí -	II-16-88
002	1700_03_M	Oryzica 3	Valle/Jamundí	II-16-88
003	1929_01_M	Oryzica 3	Valle/Jamundí	II-01-88
004	1929_02_M	Oryzica 3	Valle/Jamundí	II-01-88
005-R1	1953_02r1	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
005-R2	1953_02r2	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
011	1953_09_O	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
012	1953_10_O	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
014	1953_12_O	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
027	1957_05_F	F3	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
028	1957_07_F	F3	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
029	1958_01_N	No tiene	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
032	1959_03_E	Espaciador	Meta/Sta Rosa	XII-2-87
034	1959_05_E	Esparcidor	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
043	2052_03_N	No tiene	Tolima/Tolima	V-11-88
049	2054_02_N	No tiene	Tolima/Espinal	V-11-88
053	2055_04_M	No tiene	Tolima/Espinal	V-11-88
056	2058_02_N	No tiene	Tolima/ vereda aéropto.	V-11-88
063	2063_01_C	Cica 9	Tolima/Campo Alegre	V-13-88
067	2064_05_O	Oryzica 1	Tolima/Campo Alegre	V-13-88
068	2065_01_O	Oryzica 3	Tolima/Campo Alegre	V-13-88
078-b	2369_1r_O	Oryzica llanos 5-1	Tolima/	VII-99
092 br	2630_R_Oz	Oryzica 1	Valle/Jamundí	VI-23-99
102	2679_01_F	Fedearroz 50	Meta/Castilla la Nueva	XII-01-99
113	2745_01_P	Pasto Argentina	Meta/Sn Carlos dGuarona	IIIX-15-02
130	2764_06_N	No tiene	Brasil/Brasil - Irga	2003- III
143-b	2792_Oz3	Oryzica 3	Tolima/chenche	IV-00
144	2793_F50	Fedearroz 50	Tolima/Purificación	IV-00
158	2813_E_ic	<i>Sclerotium-ica</i>	Casanare/Yopal	IX-03
159	2814_E_ic	<i>Sclerotium-ica</i>	Casanare/Yopal	IX-03
160	2815_Rhz_	Rh ica EVELIO	Casanare/Yopal	IX-03
161	2816_E_ic	<i>Sclerotium-ica</i>	Casanare/Yopal	IX-03
162	2817_E_ic	<i>Sclerotium-ica</i>	Casanare/Yopal	IX-03
163	2818_E_ic	<i>Sclerotium-ica</i>	Casanare/Yopal	IX-03
164	2819_E_ic	<i>Sclerotium-ica</i>	Casanare/Yopal	IX-03
171	2826_M_F5	Fedearroz 50	No tiene/No tiene	II-03
191	2724_1_M_	Oryzica 3	No tiene/No tiene	XI- -01
197	2836_RhAG	AG1-I-C-M43 Frijol	No tiene/No tiene	X-96
198	2835_RhAG	AG1-Frijol	No tiene/No tiene	X-96
202	2769_1_M_	Fedearroz 2000	Valle/Jamundí	V-23-03
203	2832_F50	Fedearroz 50	No tiene/No tiene	Xii- -04
NR1	NR1_Rh_s_	Suelo MER 3-4	Tolima/saldaña	VII-91
008	1953_06_O	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
009	1953_07_O	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
016	1954_01_C	Cica 4	Tolima/Saldaña	III-25-88
042	2052_02_N	No tiene	Tolima/Tolima	V-11-88
057	2059_01_N	No tiene	Tolima/Tolima	V-10-88

**Tabla 2. (Continuación).**

Código	# registro	Origen	Origen geográfico	Fecha de Colecta
058	2059_02_N	No tiene	Tolima/Tolima	V-10-88
059	2060_01_N	No tiene	Tolima/ vereda aeropto	V-10-88
060	2061_01_C	Cica 4 ?	Tolima/Ambalema	V-10-88
061	2062_01_C	Cica 4 ?	Tolima/Ambalema	V-10-88
062	2062_02_C	Cica 4 ?	Tolima/Ambalema	V-10-88
069 -1-	2065_02_O	Oryzica 3	Tolima/Campo Alegre	V-12-88
071	2237_01_N	No tiene	Cesar/Agua Chica	III- -89
072	2237_02_N	No tiene	Cesar/Agua Chica	III- -89
073db	2313-06_O	Orizica 3	Tolima/Ibague	VI-I-90
083	2399_01_O	<u>Oryzica 1</u>	Tolima/Tolima	III- -93
095	2640_01_E	Esparcidor	Meta/Santa Rosa	IIIX-10-99
106	2695_01_F	Fedearroz 50	Tolima/Tolima	X-18-00
111da	2738_01_F	Fedearroz 50	Meta/Pompeya	IIIX-01-02
112	2744_01_R	Brachiaria	Meta/Acacias	IIIX-15-02
117	2749_01_C	CT13478-19-7-1-M	Meta/Santa Rosa	IIIX-15-02
132	2777_F50	Fedearroz 50	Tolima/Saldaña	III-00
133	2778_F50	Fedearroz 50	Tolima/Saldaña	III-00
135	2780_F50	Fedearroz 50	Tolima/Saldaña	III-00
146	2795_Oz1	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	IV-00
147	2796_M_F5	Fedearroz 50	Tolima/Purificación	X-00
150	2800_F50	Fedearroz 50	Tolima/Saldaña	III-00
154	2806_F50	Fedearroz 50	Tolima/Saldaña	III-00
155	2805_F50	Fedearroz 50	Tolima/Purificación	III-00
156	2810_F50	Fedearroz 50	Tolima/Saldaña	III-00
165	2820_ROS_	ROS P2 ni/03	Uruguay/Uruguay	III-00
170	2825_F50	Fedearroz 50	Meta/granada	II-03
173	2828_Rh_s	Suelo	Tolima/saldaña	II-03
174	2829_CF_2	<u>CF-205</u>	Tolima/saldaña	<u>II-03</u>
175	2830_Rh_s	<u>suelo saldaña</u>	Tolima/saldaña	<u>II-03</u>
194	2767_FB00	FB007CIAT	No tiene/No tiene	ix- -97
201	2768_F200	Fedearroz 2000	Valle/Jamundí	V-30-03
2854	2854_Tai4	Tailandia 4	Tolima/Saldaña	II-04
005	1953_02_O	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
010	1953_08_O	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
015	1953_13_O	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-25-88
017	1954_02_C	Cica 4	Tolima/Saldaña	III-25-88
018	1954_03_C	Cica 4	Tolima/Saldaña	III-25-88
019	1954_04_C	Cica 4	Tolima/Saldaña	III-25-88
020	1954_05_C	Cica 4	Tolima/Saldaña	III-25-88
021	1954_06_C	Cica 4	Tolima/Tolima	III-25-88
023	1954_08_C	Cica 4	Tolima/Saldaña	III-25-88
025	1957_02_F	F3	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
031	1959_02_E	Esparcidor	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
037	1959_09_E	Esparcidor	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
038	1959_10_E	Esparcidor	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
040	1959_12_E	Esparcidor	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
044	2052_04_N	No tiene	Tolima/Tolima	V-11-88
046	1959_11_E	Esparcidor	Meta/Santa Rosa	XII-02-87
048	2054_01_N	No tiene	Tolima/Salda	V-11-88
061-r1	2062_1r_C	Cica 4 ?	Tolima/Ambalema	VI-3-88
065da	2064_02_O	Oryzica 1	Tolima/Campo Alegre	V-13-88

**Tabla 2.** (Continuación).

Código	# registro	Origen	Origen geográfico	Fecha de Colecta
066	2064_03_O	Oryzica 1	Tolima/Campo Alegre	V-13-88
078	2367_01_O	Oryzica 3	Húila/Hacienda San Isidro	VI-91
083 r1	2399_01_O	<u>Oryzica 1</u>	Tolima/Tolima	III- -93
088	2493_01_O	O. Caribe 8	Tolima/La balsa	VII-13-95.
089	2585_01_I	IR 8	Meta/Sta Rosa	V-15-97
090	2587_IR42	IR 42	Meta/Sta Rosa	V-15-97
092-bdb	2630_Oz1	Oryzica 1	Valle/Jamundí	VI-23-99
093	2631_01_O	Oryzica 1	Tolima/Purificación	VIII-10-99
099	2599_F50	Fedearroz 50	Meta/Santa Rosa	X-25-02
106-bda	2695_02_F	Fedearroz 50	Tolima/Tolima	X-18-00
106-C	2695_F50	Fedearroz 50	Tolima/Tolima	X-18-00
107-b	2704_1_M_	Fedearroz 2000	Valle/Jamundí	IV- -01
108	2714_01_N	No trajo	Meta/Santa Rosa	IX-06-01
109	2735_01_P	Progreso	Meta/Santa Rosa	IIX-01-02
110	2737_01_C	CT13737	Meta/Pompeya Meta	IIX-01-02
115	2747_01_F	FL00798-10p-7-1p-M	Meta/Santa Rosa	IIX-15-02
116	2748_01_M	CT13479-M-2-2-M	Meta/Santa Rosa	IIX-15-02
118	2750_01_C	CT1030-15...4-4	Meta/Santa Rosa	IIX-15-02
119	2751_01_M	No tiene	Tolima/Tolima	VII-26-02
120	2752_01_M	No tiene	Meta/Pompeya	IIX-15-02
121	2753_01_M	No tiene	Meta/Pompeya	IIX-15-02
123 db	2756_01_L	#26 (LMV26)	Valle/La cumbre - Bitaco	2002- XI
131	2775_F50	Fedearroz 50	1/Madroño	III-00
136	2782_Oz1	Oryzica 1	Tolima/Chonche	III-00
137	2783_Oz1	Oryzica 1	Tolima/¿Bausa?	III-00
138	2785_F50	Fedearroz 50	Tolima/Saldaña	III-00
139	2786_Oz1	Oryzica 1	Tolima/Espinal	III-00
141	2788_Oz1	Oryzica 1	Tolima/Saldaña	III-99
143	2791_F50	Fedearroz 50	Tolima/Saldaña	III-99
145	2794_F50	Fedearroz 50	Tolima/Castilla	IV-00
148	2798_F50	Fedearroz 50	Tolima/Purificación	II-00
151	2801_Oz3	Oryzica 3	Tolima/Saldaña	III-00
166	2821_ROS_	ROS P2 ni/04	Uruguay/Uruguay	III-00
168	2823_F50	Fedearroz 50	Meta/San carlos	II-03
169	2824_F50	Fedearroz 50	Meta/Pompeya	II-03
190	2705_M_FV	Fedearroz Victoria 1	No tiene/No tiene	VI- -01
193	2766_qR_6	qR49403006	No tiene/No tiene	XI-08 -01
2770r3	2770r3_F5	Fedearroz 50	Meta/Santa Rosa	V-23-03
2390	2390_Rh_s	suelo saldaña	Tolima/Saldaña	VII-12-91
2399c1	2399c.1_O	<u>Oryzica 1</u>	Tolima/Tolima	III- -93
2399c3	2399c3_Oz	<u>Oryzica 1</u>	Tolima/Tolima	III- -93
2399-1r	2399_1r_O	<u>Oryzica 1</u>	Tolima/Tolima	III- -93



**Tabla 3.** Origen geográfico de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Centro		Occidente	Oriente		Costa
Tolima	Huila	Valle del Cauca	Llanos Meta	Llanos Casanare	Cúcuta
Meseta Ibagué	Campo Alegre	Jamundi	Villavicencio	Villanueva	Varios
Saldaña	Neiva	López Adentro	Santa Rosa	Yopal	Fundación
Ambalema		Robles	Matazul	Agua Azul	La Jagua
Espinal			Puerto López		Montería
Ibagué			Sn Carlos Guaroa		Valledupar
Otros			Acacias		
			La Balsa		

Los aislamientos fueron colectados por una colaboración entre CIAT, ICA y Fedearroz

**2.2.2 Aislamiento del hongo.** Las muestras de tejido de hojas y tallos con lesiones típicas del hongo o con esclerocios de *Rhizoctonia* se almacenaron en sobres de papel adecuadamente rotulados con sus datos de pasaporte y transportados a temperatura ambiente hasta el laboratorio. El tejido fue limpiado de hongos saprofitos y de bacterias con un flujo continuo de agua por 30 minutos, posteriormente colocado en cámaras húmedas de caja de petri por 24 a 48 horas, en oscuridad a 28 °C. El micelio formado en las lesiones se traspasado a cajas de petri con 20 ml de medio agar-salvado (2% agar, 3% Salvado p/v y 10 microgramos de ampicilina por mililitro) cubierto con trozos de papel de filtro 3M e incubados por espacio de 6 días en oscuridad a 28 °C. El papel filtro cubierto con micelio y/o esclerocios fue retirado del medio y secado en incubadora con flujo de aire a 28 °C durante 5 días; luego almacenado en sobres de papel mantequilla (70 gr/metro cuadrado) a -20 °C por tiempo indefinido.

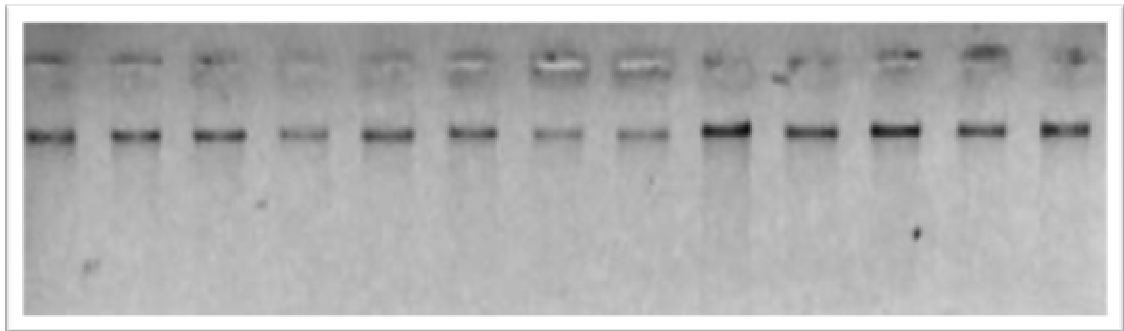
Obtención de aislamientos monotáticos: Cada aislamiento fue crecidos 16 horas en caja de petri con medio PDA sin antibiótico y sub cultivada la punta de una hifa individual en medio agar-salvado durante tres días, convirtiendo convirtiendo cada aislamiento en un cultivo monotático puros (Figura 1) que posteriormente fue almacenado en papel filtro.



**Figura 1.** Fotografía en estereoscopio de micelio de *R. solani* AG1-IA, aislamiento 2399 crecido por 16 horas en medio de cultivo PDA. Fotografía tomada por Cristian Olaya (CIAT – Palmira 2.004)

### 2.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Trozos pequeños de papel filtro de cada uno de los aislamientos monotático fueron inoculados en un erlenmeyer con 50 ml de medio líquido completo (Anexo A) e incubados a temperatura ambiente sin agitación durante 8 días; posteriormente el micelio crecido fue retirado del medio, secado, almacenado en viales de vidrio y liofilizado durante 16 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El micelio liofilizado fue macerado y su ADN extraído mediante el protocolo de extracción a base de Fenol, creado por Matthew Mawhorr y descrito por Escobar y Correa (1.999) (Anexo A). Una vez extraído el ADN su calidad fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% p/v y teñido con bromuro de etidio (Figura 2). Para cada muestra de ADN se estimó la concentración de ADN mediante fluorometría utilizando el fluorómetro DyNA Quant 2000 de la compañía Hoeffer, siguiendo las instrucciones del manual.



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa 1% de ADN total de algunos aislamientos de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

#### 2.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* y *R. o. sativae* VIA PCR.

Para cada aislamiento se hizo diagnóstico de especie vía PCR usando cinco combinaciones de primers con capacidad para amplificar exclusivamente las especies *R. Solani*, *R. oryzae sativae* y *R. oryzae*. Estos primers fueron diseñados a partir de secuencias de las regiones ITS de los genes rDNA ribosomal que fueron divergentes entre especies de una población de *R. oryzae* (10 aislamientos), *R. oryzae-sativae* (18 aislamientos) y *R. solani* (24 aislamientos) obtenidos de la colección de hongos del Instituto Internacional de Micología (en Inglés International Mycological Institute), en Eghan, Inglaterra (Johanson et al, 1998). Para la identificación de *R. solani* se usaron dos combinaciones de primers: GMROS-2 / ITS1 y GMROS-6 / R635; para *R. o. sativae* las combinaciones GMRS-3 / R635 y GMRS-4 / ITS1; y para *R. oryzae* la combinación de primers GMRO-3 / R635 (Tabla 4). Las condiciones de amplificación fueron las mismas usadas por Johanson y colaboradores (1998) (anexo A); los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio, a 90 voltios en Buffer TBE 0.5X por tres horas. Los geles fueron fotografiados con cámara polaroid y las bandas evaluadas visualmente.

#### 2.5 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES RAPD EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Para determinar si existe variación genética al interior de cada especie y/o grupo genético que se determinase molecularmente en la población, se hizo un breve estudio de variación genética molecular con el primer RAPD

91298 (Lilja y colaboradores 1996) que estableciera cuantos haplotipos o patrones de bandas RAPD distintos (RAPD DNA-Fingerprint) existen en la población. Las condiciones de amplificación se consignan en el anexo A). Los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio, a 90 voltios en Buffer TBE 0.5X por tres horas. Los geles fueron fotografiados con cámara polaroid y las bandas evaluadas visualmente.

**Tabla 4.** Secuencia de primers para PCR usados en este estudio.

Primer PCR	Secuencia	Objetivo para el estudio	Combinación de primers
GMROS-2 R	CGG CTC ATC CTT CAA AAA TCC	Identificación de especies: <i>R. o. sativae</i>	GMROS-2/ITS1
GMROS-6 F	CAA AGA CAG AGA GGT CGC CTC	Identificación de especies: <i>R. o. sativae</i>	GMROS-6/R635
GMRS-3 R	AGT GCA ACC AAG CAT AAC ACT	Identificación de especies: <i>R. solani</i>	GMRS-3/ITS1
GMRS-4 R	CGG TTC ATC TGC ATT TAC CTT	Identificación de especies: <i>R. solani</i>	GMRS-4/ITS1
GMRO-3 F	TAC GCC TTG AAG TCC CTG TAG	Identificación de especies: <i>R. oryzae</i>	GMRO-3/R635
R635 R	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	Identificación de especies: <i>R. oryzae</i> y <i>R. o. sativae</i>	GMROS-6/R635
ITS-1 F	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Clasificación de especies	ITS-1/ITS-2, ITS1/ITS-4.
ITS-2 R	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	Clasificación de especies	ITS-1/ITS-2.
ITS-3 F	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GCTCC	Clasificación de especies	ITS-3/ITS-4.
ITS-4 R	TCC GCT TAT TGA TAT GC	Clasificación de especies	ITS-3/ITS-4, ITS1/ITS-4.
RAPD 91298	GGA CGA TTC G	Clasificación de especies	

R: Primer reverse. F: Primer Forward

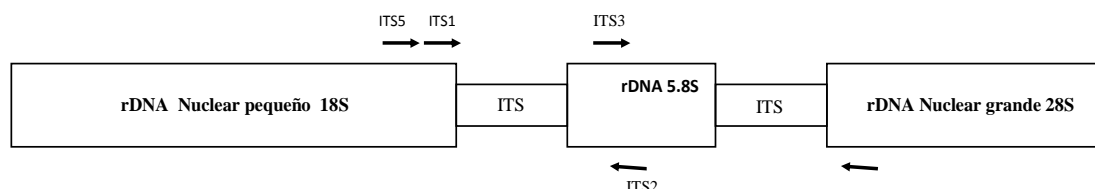
Especies usadas como control: *Pyricularia oryzae*, *Sarocladium*, *Sclerotium hidrophyllum*, *Phomosis oryzae*, *Alternaria padevickii*, *Gaeumannomyces graminis*, *Bipolaris sp*, *Monographel halbesceus*.

Inespecificidades: Primers GMRS-4/ITS1 específicos para *R. solani* que amplificaron a *Sclerotium hidrophyllum* y *Gaeumannomyces graminis*.

## 2.6 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS ESPACIADORAS DE TRASCRIPTO INTERGÉNICO ITS, DE LOS GENES rDNA RIBOSOMAL.

**2.6.1 Amplificación vía PCR de las secuencias ITS.** Cada aislamiento fue amplificado vía PCR con dos combinaciones de primers universales de la región ITS de los genes rDNA ribosomal del hongo (Liu and Sinclair, 1993; White *et al*, 1990). Las combinaciones fueron las parejas de primers ITS1 / ITS2 e ITS 3 / ITS 4 (Figura 3). Las condiciones de amplificación se consignan en el anexo A). Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio, a 90

voltios en Buffer TBE 0.5X por 3 horas. Los geles fueron fotografiados las bandas evaluadas visualmente.



**Figura 3.** Esquema de los genes nucleares de rDNA ribosomal con indicación de la posición de los primers ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5. Tomado de White *et al*, 1990.

**2.6.2 Análisis de restricción de secuencias ITS.** Los productos de PCR de las combinaciones de primers ITS1/ITS2 e ITS3-ITS4 fueron digeridos individualmente con cada una de las enzimas de restricción MBOI, HinfI, EcoRI, HaeIII y Taq I; Para ello 10 ul de PCR de cada aislamiento fueron digeridos con 15 Unidades de cada enzima, a 37 °C durante toda la noche, excepto para la enzima Taq I que fue incubada a 65 °C. Los productos de las digestiones fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 3%, a 80 voltios en buffer TBE 0.5X durante tres horas. La tinción de los geles se hizo mediante tinción con bromuro de etidio; cada gel fue fotografiado y evaluado su patrón de bandas de manera visual. La evaluación de los geles se hizo identificando cada una de las bandas de los perfiles de cada marcador y atribuyendo el valor de uno (1) a la presencia de la banda en un individuo específico y el valor de cero (0) a la ausencia; esta información fue organizada en tabla de contingencia con las variables aislamiento y banda (presencia y/o ausencia).

El análisis de los fragmentos de restricción del PCR de la región ITS1/ITS2 no fue realizado por limitantes de impedancia en el sistema de electroforesis debidos al pequeño tamaño de los fragmentos generados con la restricción. El análisis de restricción de la región ITS3-ITS4 generó una matriz de datos de 140 aislamientos por 42 bandas

**2.6.3 Análisis Estadístico de los Marcadores ITS.** Para el conjunto de datos obtenidos a partir de la amplificación y digestión de los productos de PCR de la región ITS3-ITS se hicieron dos tipos de análisis: un análisis de correspondencia múltiple y varios análisis de similaridad genética con índice de DICE.

**2.6.3.1. Análisis de similitud Genética.** El análisis de similitud se aplicó a tres conjuntos de datos: 1) a la matriz de los datos arrojados por la electroforesis de los productos de PCR ITS3/ITS4 sin digerir, 2) Individualmente a la matriz de datos de cada una de las cinco digestiones de los productos de PCR ITS3/ITS4 (cinco matrices en total) y 3) a la unión de las cinco matrices de digestiones en una sola matriz general; este análisis fue denominado Análisis Global de Similitud “AGS”. A la unión de las matrices de digestión y de los productos de PCR sin digerir se le practico el mismo análisis de similitud, obteniéndose los mismos resultados que el análisis AGS; por eso no se tuvo en cuenta.

**2.6.3.2 Análisis de Correspondencia Múltiple.** Se realizó un análisis de correspondencia múltiple A. C. M. a la unión de las matrices de las 5 digestiones con la matriz de los productos de PCR sin digerir. Para este análisis las filas de la matriz se organizaron de acuerdo a las cualidades de los aislamientos (Hospedero, fecha, origen, número de registro); las columnas representaron los distintos *loci* evaluados (bandas de los marcadores); así para cada aislamiento apareció una variable binaria (presencia / ausencia) dependiendo de la aparición o no de la banda respectiva, obteniéndose entonces una situación excluyente en la cual cada individuo responde a modalidades mutuamente excluyentes y de manera obligatoria.

## **2.7 REVISIÓN MORFOLÓGICA**

Con el fin de tener un acercamiento preliminar a la identidad de cada uno de los grupos genéticos que establecería el Análisis Global de Similitud (AGS) del estudio de restricción ITS3/ITS4, se seleccionaron 18 aislamientos a los cuales se les revisó su morfología de crecimiento en medio artificial PDA. (Tabla 5). Los 18 aislamientos fueron crecidos cada uno en caja de petri con medio agar-salvado por espacio de seis días, posteriormente inóculos cilíndricos de 5 mm de diámetro fueron colocados en el centro de cajas de petri con exactamente 20 ml de medio de cultivo PDA sin antibiótico e incubadas a 28 °C en oscuridad durante tres semanas.

**Tabla 5.** Diez y ocho aislamientos que representan la diversidad genética molecular de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Número de Registro	Grupo genético molecular AGS	Código de laboratorio	Hospedero	Fecha de colecta semestre
2768	AGS-1	r3-201	Fedearroz2000	03A
2063_01	AGS-3	r3-63	Cica9	88A
2766	AGS-4	r3-193	qR45403006	96B
2775	AGS-5	r3-131	Fedearroz50	00B
2777	AGS-6	r3-132	Fedearroz50	00A
2792	AGS-6	r3-143-b	Oryzica3	00A
2785	AGS-7	r3-138	Fedearroz50	00A
2705	AGS-8	r3-190	Fed. Vict 1	01A
2399_01	AGS-9	r3-83	Oryzica1	93A
2599	AGS-9	r3-99	Fedearroz50	02B
2769_1_M	AGS-9	r3-202	Fedearroz2000	03A
2695-1	AGS-9	r3-106	Fedearroz50	00B
1959_03	AGS-10	r3-32	Espaciador	87B
1929_01_M	AGS-11	r3-3	Oryzica3	88A
2756_01	AGS-12	r3-123	#26(LMV26)	02B
2813	AGS-13	r3-158	<i>Sclerotium</i>	03B
1700_02_M	AGS-14	r3-001R	Oryzica3	88A

El aislamiento 2854 del grupo #2 no pudo ser recuperado para los estudios de morfología y patogenicidad, por lo tanto no se incluye en la lista ni en los análisis

## 2.8 ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD

Los 18 aislamientos del estudio de revisión morfológica fueron usados para la determinación de la patogenicidad de cada grupo genético; para ello cada uno fue inoculado sobre dos variedades de arroz susceptibles (Fedearroz 2000, Fedearroz 50), dos variedades tolerantes (Oryzica 1 y Oryzica 3) y una especie silvestre tolerante (*Oryza rufipogon*). Las inoculaciones se realizaron bajo condiciones controladas en invernadero. Estos estudios permitirán conocer la sintomatología causada por los aislamientos representantes de cada grupo genético y su asociación con alguna parte específica de la planta, tallo u hojas, determinando si la enfermedad del añublo de la vaina en Colombia participa en un complejo de varias enfermedades causadas por distintos patógenos presentes en la colección. También se podrá establecer si existe alguna interacción aislamiento cultivar o diferencias de agresividad en distintos cultivares de

arroz que podrían tener implicaciones importantes en el programa de mejoramiento del CIAT.

**2.8.1 Metodología de inoculación.** Cinco semillas de cada uno de los cinco cultivares de arroz fueron crecidas en materos de 20 cm de diámetro conteniendo 3 Kg. de suelo estéril fertilizados con dosis comerciales de nitrógeno (180 Kg por hectárea), Fósforo (60 Kg./ha.) y Potasio (60 Kg./ha). La inoculación se hizo colocando en la base del tallo de cada planta un inóculo consistentes en bloques cilíndricos de medio cubierto con el hongo crecido por 8 días (bloques de agar-salvado con 3 mm de diámetro) (Figura 4). Cada aislamiento se inoculó en las cinco plantas de cada pote de cada variedad; se hicieron dos repeticiones más de cada variedad. Las plantas inoculadas fueron incubadas por 15 días dentro de cámaras plásticas instaladas en invernadero, manteniendo temperatura de 28 °C y humedad relativa entre 80 y 100%. Las dimensiones de las jaulas usadas fueron 1.7 metros de altura por 3.0 metros de ancho y 2.7 metros de fondo. La humedad relativa necesaria fue mantenida mediante aspersión de agua durante los 15 días de incubación, usando humidificadores en los periodos de 9:00 A. M. a 11:00 A. M. y 2:00 P. M. a 4:00 P. M (Figura 5). El diseño experimental de las inoculaciones fue de bloques al azar con tres repeticiones simultáneas de cinco plantas cada una. Al interior de cada repetición el orden de las variedades fue aleatorizado. Al interior de cada bloque el orden de los aislamientos a inocular fue aleatorizado (Figura 6).



**Figura 4.** Inoculación de la variedad de arroz Fedearroz 50 con inóculo del hongo *Rhizoctonia solani* AG1-IA, aislamiento 2399. (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).





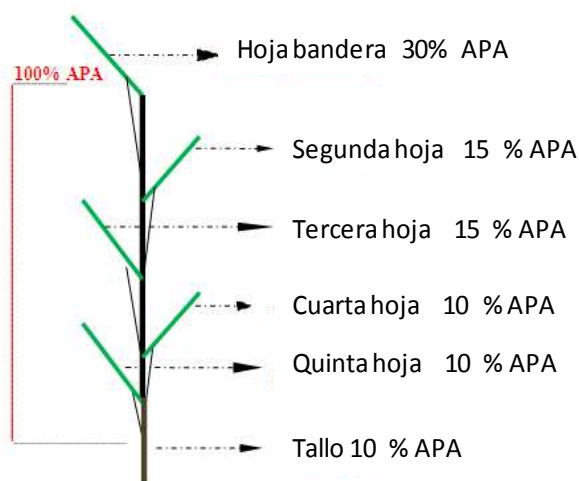
**Figura 5.** Cámara húmeda de plástico con techos, paredes y compuerta herméticas que mantienen la humedad relativa entre 80% y 100%, en la que se realiza la inoculación de los aislamientos de *R. solani* y demás hongos del estudio. (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).

**2.8.2 Evaluación de plantas.** Las evaluaciones se hicieron 15 días después de la inoculación usando la metodología desarrollada por el IRRI (1996) con modificaciones del CIAT. La escala de evaluación consiste en asignar valores de % de Área de Planta Afectada (APA) de acuerdo al ascenso vertical del hongo, desde la base del tallo hacia la hoja superior o bandera (Figura 7). Cuando el patógeno enferma todo el tallo hasta abajo de la quinta hoja se asigna un valor de 20% APA; si la afección es parcial, se asigna un porcentaje APA proporcional al área de tallo afectada. Si el patógeno asciende y afecta la hoja más baja de la planta (quinta hoja) a esta área se asigna un valor de 10% APA. Para determinar hasta aquí el % APA total, se suma el 20% de APA correspondiente al tallo base más el 10% APA de la quinta hoja, dando un valor total de 30% de APA. A la afectación de la segunda, tercera, cuarta y quinta hoja se asignan valores de % APA de 10, 15, 15 y 30% respectivamente. La suma total de estas áreas es igual a 100. Una planta se considerada susceptible cuando el %APA es superior al 20% (las lesiones afectan la totalidad y alcanzan la quinta hoja).

Repetición 1	Inóculo	Cultivar					Inóculo	Cultivar					Inóculo	Cultivar				
	2768	3	2	4	5	1	2813	4	5	2	1	3	2832	3	2	1	4	5
	2063-1	3	4	2	1	5	2785	2	3	5	4	1	2756	4	2	1	5	3
	2769-1	4	3	2	1	5	2792	5	3	2	1	4	2777	3	1	2	4	5
	2599	2	5	3	1	4	2695-1	4	1	2	3	5	2766	1	5	4	3	2
	2399	1	2	4	3	5	2775	4	2	1	5	3	1700-2	1	5	3	2	4
Repetición 2	1929-1	4	5	1	2	3	1959-3	4	5	1	3	2	2705	3	4	2	5	1
	Inóculo	Cultivar					Inóculo	Cultivar					Inóculo	Cultivar				
	2792	1	5	3	2	4	1959-3	4	5	1	2	3	1700-2	4	5	1	3	2
	2813	1	5	4	2	3	2768	3	4	2	5	1	2599	5	1	4	3	2
	2832	3	5	2	4	1	2756	4	1	3	2	5	1929-1	3	4	1	5	2
	2705	2	3	5	1	4	2769-1	1	4	5	3	2	2399	2	4	5	1	3
Repetición 3	2785	1	5	3	4	2	2695-1	5	2	1	3	4	2775	3	2	4	1	5
	2777	3	5	4	1	2	2766	1	2	3	4	5	2063	1	5	2	3	4
	Inóculo	Cultivar					Inóculo	Cultivar					Inóculo	Cultivar				
	1700-2	2	3	5	1	4	1959-3	3	1	5	4	2	2695-1	2	1	3	4	5
	2766	1	2	4	3	5	2775	4	5	1	2	3	2832	5	2	4	1	3
	2566-1	5	2	4	1	3	2792	1	3	5	2	4	2785	5	4	2	3	1
Repetición 3	2599	1	5	2	4	3	2777	4	5	1	2	3	2768	3	4	5	2	1
	1929-1	4	5	2	3	1	2063-1	3	5	4	2	1	2769-1	5	2	4	3	1
	2705	2	4	1	3	5	2399	5	3	1	4	2	2813	5	1	3	2	4

**Figura 6.** Plano de inoculación de 18 aislamientos correspondientes a 13 de 14 grupos genéticos AGS de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia sobre cinco cultivares.

Cultivares: (1) Oryzica 1, (2) Fedarroz 2000, (3) Oryzica 3, (4) *Oryza Rufipogon*, (5) Fedearroz 50.  
Inoculo= Aislamiento



**Figura 7.** Escala de evaluación en invernadero de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz (IRRI) modificada por CIAT. La medición se hace según avance de la enfermedad desde la base del tallo hacia la hoja bandera.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

**3.1.1 Población del hongo, aislamientos monotálicos.** En este estudio se usaron cultivos monotálicos del hongo, asegurando así que cada aislamiento analizado represente a un único individuo del complejo *Rhizoctonia* (ó de la especie a que corresponda), no a una mezcla de dos o mas individuos que pudieran estar integrando al esclerocio o lesión colectada del campo. Es un echo registrado que en campo pueden coexistir simultaneamene varias especies de hongos, como en India donde se han reportado infecciones simultaneas de dos de las especies *R. solani*, *R. oryzae* y *R. oryzae-sativae* a una misma planta (Turner et al, 1999). De no usar aislamientos monotálicos cada individuo de la población podría tener la información de una mezcla aislamientos.

#### 3.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia. oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae* VIA PCR

El diagnostico de especies vía PCR permitió la identificación de 113 aislamientos como *R. solani* (80.7%) de los que 95 fueron identificados con las dos combinaciones de primers específicos a *R. solani* (GMRS-3/ITS1 y GMRS-4/ITS1) (Figura 8), trece aislamientos por solo la combinación GMRS-3/ITS1 y cinco aislamientos por sólo la combinación GMRS-4/ITS1 (Tabla 6). El aislamiento 2768 fue clasificado simultáneamente de manera ambigua como las dos especies *R. oryzae-sativae* y *R. oryzae*; los aislamientos 1929-01 y 2752-01 fueron clasificados simultáneamente como *R. solani* y *R. oryzae*; los aislamiento 1700-02 y 1959-03 como las tres especies. Ningún aislamiento fue clasificado solamente como *R. oryzae-sativae* ni como *R. oryzae* (Tabla 7). 26 aislamientos de la población (18.5%) no amplificaron ninguna banda con las cinco combinaciones de primers especie específicos de Johanson.

La importancia de la metodología de PCR para la identificación de las especies *R. solani*, *R. oryzae* y *R. o. sativae* radica en que la enfermedad del añublo de la vaina del arroz, hace parte de un complejo de enfermedades de la vaina causadas por múltiples y diversos agentes patogénicos con morfología y sintomatología similares (Parmeter, 1967; Johanson et al, 1998), entre las que se incluyen las tres especies de *Rhizoctonia*. Poder identificar estas especies de manera rápida vía PCR mejoraría no solo el entendimiento epidemiológico de la enfermedad sino también su control

químico durante las etapas de tempranas de la enfermedad. Algunas especies de *Rhizoctonia* con morfología similar a *R. solani* y que son de diagnóstico difícil o imposible en campo, responden de manera diferencial al tratamiento con carbendazin, un fungicida de amplio espectro (Turner et al, 1999). Para implementar este sistema de diagnóstico en la región es necesario rediseñar nuevos primers a partir de secuencias ITS divergentes entre las poblaciones colombianas de *R. solani*, *R. oryzae* y *R. o. sativae*; incluyendo principalmente a los aislamientos que fueron clasificados ambiguamente en más de una especie (el 2752, 1929, 1959-03 y 1700-02) y los de morfología atípica a *R. solani* que fueron clasificados como tal (2766 y 2063).

**Tabla 6.** Identificación molecular de especies vía PCR con primers especie específicos de Johansen y colaboradores (1.998) y asignación de grupos genéticos AGS del análisis de restricción de la región ITS3/ITS4 del ADN ribosomal en la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Hospedero	Localidad - Zona	Fecha de colecta	# de carril en gel	Codigo	Registro	Grupo AGS	<i>R. solani</i> GMRS4/ITS1	<i>R. solani</i> GMRS3/ITS1	<i>R. o. sativae</i> GMROS2/ITS1	<i>R. o. sativae</i> GMROS2/R635	<i>R. oryzae</i> GMROS3/R635
Oryzica 3	Jamundi - Valle	II-16-88	1	r3-001R	1700_02_M	14	+		P		+
Oryzica 3	Jamundi - Valle	II-16-88	2	r3-2	1700_03_M	14					
Oryzica 3	Jamundi - Valle	II-01-88	3	r3-3	1929_01_M	11	+	+			V
Oryzica 3	Jamundi - Valle	II-01-88	4	r3-4	1929_02_M	11	+	+			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	5	r3-005-R1	1953_02r1	9	+	+			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	6	r3-005-R2	1953_02r2	9		T			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	7	r3-11	1953_09_O	9		+			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	8	r3-12	1953_10_O	9	+	+			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	9	r3-14	1953_12_O	9	T/P				
F3	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	10	r3-27	1957_05_F	9	+	+			
F3	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	11	r3-28	1957_07_F	9	+	+			
No tiene	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	12	r3-29	1958_01_N	9	+	+			
Espaciador	Sta Rosa - Meta	XII-2-87	13	r3-32	1959_03_E	10	+	+		T	T
Espaciador	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	14	r3-34	1959_05_E	10	+	+			
No tiene	Tolima - Tolima	V-11-88	15	r3-43	2052_03_N	9	T/P				
No tiene	Espinal - Tolima	V-11-88	16	r3-49	2054_02_N	9	T/P				
No tiene	Espinal - Tolima	V-11-88	18	r3-53	2055_04_M	9		T	+		
No tiene	Tolima vda apto. - Tolima	V-11-88	19	r3-56	2058_02_N	9	T/P				
Cica 9	Campo Alegre - Tolima	V-13-88	20	r3-63	2063_01_C	3	+	+			
Oryzica 1	Campo Alegre - Tolima	V-13-88	21	r3-67	2064_05_O	9	+	L			
Oryzica 3	Campo Alegre - Tolima	V-13-88	22	r3-68	2065_01_O	9	+	+			
Oryzica llanos 5-1	N. D. - Tolima	VII-99	23	r3-078-b	2369_1r_O	9	+	+			
Oryzica 1	Jamundi - Valle	VI-23-99	24	r3-092br	2630_R_Oz	9	+	+			
Fedearroz 50	Castilla la Nueva - Meta	XII-01-99	25	r3-102	2679_01_F	9	+	+			
Pasto Argentina	SnCarlo Guarona - Meta	II-X-15-02	27	r3-113	2745_01_P	9	+	+			
No tiene	Brasil - Irga - Brasil	2003- III	28	r3-130	2764_06_N	9	+	+			
Oryzica 3	chenche - Tolima	IV-00	30	r3-143-b	2792_Oz3	6					
Fedearroz 50	Purificación - Tolima	IV-00	31	r3-144	2793_F50	12	+	+			
<i>Sclerotium-ica</i>	Yopal - Casanare	IX-03	33	r3-158	2813_E_ic	13	+				
<i>Sclerotium-ica</i>	Yopal - Casanare	IX-03	34	r3-159	2814_E_ic	13					
Rh ica EVELIO	Yopal - Casanare	IX-03	35	r3-160	2815_Rhz_	10	+	+			
<i>Sclerotium-ica</i>	Yopal - Casanare	IX-03	36	r3-161	2816_E_ic	13	+	+			
<i>Sclerotium-ica</i>	Yopal - Casanare	IX-03	37	r3-162	2817_E_ic	13					
<i>Sclerotium-ica</i>	Yopal - Casanare	IX-03	38	r3-163	2818_E_ic	13	+	+			
<i>Sclerotium-ica</i>	Yopal - Casanare	IX-03	39	r3-164	2819_E_ic	13					
Fedearroz 50	N. D. - N. D.	II-03	40	r3-171	2826_M_F5	9	+	+			
Oryzica 3	N. D. - N. D.	XI- -01	41	r3-191	2724_1_M_	9	+	+			
AG1-I-C-M43 Frijol	N. D. - N. D.	X-96	42	r3-197	2836_RhAG	12	+	+			
AG1-Frijol	N. D. - N. D.	X-96	43	r3-198	2835_RhAG	12		+			
Fedearroz 2000	Jamundi - Valle	V-23-03	44	r3-202	2769_1_M_	9	+	+			
Fedearroz 50	N. D. - N. D.	Xii- -04	45	r3-203	2832_F50	9	+	+			
Suelo MER 3-4	saldaña - Tolima	VII-91	46	r3-NR1	NR1_Rh_s_	13	+	MT			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	47	r3-8	1953_06_O	9	+	+			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	48	r3-9	1953_07_O	9	+	+			
Cica 4	Saldaña - Tolima	III-25-88	49	r3-16	1954_01_C	9	+	+			
No tiene	Tolima - Tolima	V-11-88	50	r3-42	2052_02_N	9	+	+			
No tiene	Tolima - Tolima	V-10-88	51	r3-57	2059_01_N	9	+	+			

**Tabla 6. (Continuación)**

	Localidad - Zona	Fecha de colecta	# de carril en gel	Codigo	Registro	Grupo AGS	<i>R. solani</i> GMRS4/ITS1	<i>R. solani</i> GMRS3/ITS1	<i>R.o. sativae</i> GMROS2/ITS1	<i>R.o. sativae</i> GMROS2/R635	<i>R. oryzae</i> GMRO3/R635
No tiene	Tolima - Tolima	V-10-88	52	r3-58	2059_02_N	9	+	+			
No tiene	Ibagué Vda AptoTolima	V-10-88	54	r3-59	2060_01_N	9		+			
Cica 4 ?	Ambalema - Tolima	V-10-88	55	r3-60	2061_01_C	9	+	+			
Cica 4 ?	Ambalema - Tolima	V-10-88	56	r3-61	2062_01_C	9	+	+			
Cica 4 ?	Ambalema - Tolima	V-10-88	57	r3-62	2062_02_C	9	+				
Oryzica 3	Campo Alegre - Tolima	V-12-88	59	r3-069-1	2065_02_O	9	+	+			
No tiene	Agua Chica - Cesar	III- -89	60	r3-71	2237_01_N	9	+	+			
No tiene	Agua Chica - Cesar	III- -89	61	r3-72	2237_02_N	9	+	+			
Orizica 3	Ibague - Tolima	VI-I-90	62	r3-73	2313-06_O	9	+	+			
Oryzica 1	Tolima - Tolima	III- -93	63	r3-83	2399_01_O	9	+	T			
Esparcidor	Santa Rosa - Meta	IIX-10-99	64	r3-95	2640_01_E	9	+	T			
Fedearroz 50	Tolima - Tolima	X-18-00	65	r3-106	2695_01_F	9	+	+			
Fedearroz 50	Pompeya - Meta	IIX-01-02	67	r3-111	2738_01_F	9	+	+			
Brachiaria	Acacias - Meta	IIX-15-02	68	r3-112	2744_01_R	9	+	+			
CT13478-19-7-1-M	Santa Rosa - Meta	IIX-15-02	70	r3-117	2749_01_C	9	+	+			
Fedearroz 50	Saldaña - Tolima	III-00	72	r3-132	2777_F50	6					
Fedearroz 50	Saldaña - Tolima	III-00	73	r3-133	2778_F50	6	+	T			
Fedearroz 50	Saldaña - Tolima	III-00	74	r3-135	2780_F50	6					
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	IV-00	77	r3-146	2795_Oz1	6	+				
Fedearroz 50	Purificación - Tolima	X-00	78	r3-147	2796_M_F5	6					
Fedearroz 50	Saldaña - Tolima	III-00	79	r3-150	2800_F50	6					
Fedearroz 50	Saldaña - Tolima	III-00	81	r3-154	2806_F50	6					
Fedearroz 50	Purificación - Tolima	III-00	82	r3-155	2805_F50	6	+	MT			
Fedearroz 50	Saldaña - Tolima	III-00	83	r3-156	2810_F50	6					
ROS P2 ni/03	Uruguay - Uruguay	III-00	84	r3-165	2820_ROS_	6	+	MT			
Fedearroz 50	granada - Meta	II-03	85	r3-170	2825_F50	6					
Suelo	saldaña - Tolima	II-03	86	r3-173	2828_Rh_s	6					
CF-205	saldaña - Tolima	II-03	87	r3-174	2829_CF_2	6					
suelo saldaña	saldaña - Tolima	II-03	88	r3-175	2830_Rh_s	6					
FB007CIAT	N. D. - N. D.	ix- -97	90	r3-194	2767_FB00	6		+			
Fedearroz 2000	Jamundi - Valle	V-30-03	91	r3-201	2768_F200	1				T	T
Tailandia 4	Saldaña - Tolima	II-04	92	r3-2854	2854_Tai4	2	+	+			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	94	r3-5	1953_02_O	9	+	+			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	97	r3-10	1953_08_O	9	+	+			
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-25-88	98	r3-15	1953_13_O	9	+	+			
Cica 4	Saldaña - Tolima	III-25-88	99	r3-17	1954_02_C	9	+	+			
Cica 4	Saldaña - Tolima	III-25-88	100	r3-18	1954_03_C	9	+	+			
Cica 4	Saldaña - Tolima	III-25-88	101	r3-19	1954_04_C	9	+	T/P			
Cica 4	Saldaña - Tolima	III-25-88	102	r3-20	1954_05_C	9	+	+			
Cica 4	Tolima - Tolima	III-25-88	103	r3-21	1954_06_C	9	+	+			
Cica 4	Saldaña - Tolima	III-25-88	104	r3-23	1954_08_C	9	+	+			
F3	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	105	r3-25	1957_02_F	9	+	+			
Esparcidor	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	107	r3-31	1959_02_E	10	+	+			
Esparcidor	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	108	r3-37	1959_09_E	10	+	T/P			
Esparcidor	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	109	r3-38	1959_10_E	10	+	+			
Esparcidor	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	110	r3-40	1959_12_E	10	+	+			
No tiene	Tolima - Tolima	V-11-88	111	r3-44	2052_04_N	9	+	+			
Esparcidor	Santa Rosa - Meta	XII-02-87	112	r3-46	1959_11_E	9	+	+			
No tiene	Salda - Tolima	V-11-88	113	r3-48	2054_01_N	9	+	+			
Cica 4 ?	Ambalema - Tolima	VI-3-88	115	r3-061-r1	2062_1r_C	9	+	+			
Oryzica 1	Campo Alegre - Tolima	V-13-88	116	r3-65	2064_02_O	9	+	+			
Oryzica 1	Campo Alegre - Tolima	V-13-88	117	r3-66	2064_03_O	9	+	+			
Oryzica 3	Hada San Isidro - Huila	VI-91	120	r3-78	2367_01_O	9	+	+			
Oryzica 1	Tolima - Tolima	III- -93	122	r3-083r1	2399_01_O	9	+				

**Tabla 6. (Continuación)**

	Localidad - Zona	Fecha de colecta	# de carril en gel	Codigo	Registro	Grupo AGS	<i>R. solani</i> GMR54/ITS1	<i>R. solani</i> GMR53/ITS1	<i>R.o. sativae</i> GMR52/ITS1	<i>R.o. sativae</i> GMR52/R635	<i>R. oryzae</i> GMR53/R635
O. Caribe 8	La balsa - Tolima	VII-13-95.	123	r3-88	2493_01_O	10	+	+			
IR 8	Sta Rosa - Meta	V-15-97	124	r3-89	2585_01_I	9	+	+			
IR 42	Sta Rosa - Meta	V-15-97	125	r3-90	2587_IR42	10	+	+			
Oryzica 1	Jamundi - Valle	VI-23-99	126	r3-092-b	2630_Oz1	9	+	+			
Oryzica 1	Purificación - Tolima	VIII-10-99	127	r3-93	2631_01_O	9	+	+			
Fedearroz 50	Santa Rosa - Meta	X-25-02	128	r3-99	2599_F50	9	+	+			
Fedearroz 50	Tolima - Tolima	X-18-00	129	r3-106-b	2695_02_F	9	+	+			
Fedearroz 50	Tolima - Tolima	X-18-00	131	r3-106-C	2695_F50	9	+	+			
Fedearroz 2000	Jamundi - Valle	IV- -01	132	r3-107-b	2704_1_M_	9	+	+			
No trajo	Santa Rosa - Meta	IX-06-01	133	r3-108	2714_01_N	9	+	+			
Progreso	Santa Rosa - Meta	IIIX-01-02	134	r3-109	2735_01_P	9	+	+			
CT13737	Pompeya Meta - Meta	IIIX-01-02	135	r3-110	2737_01_C	9	+	+			
FL00798-10p-7-1p-M	Santa Rosa - Meta	IIIX-15-02	136	r3-115	2747_01_F	9	+	+			
CT13479-M-2-2-M	Santa Rosa - Meta	IIIX-15-02	137	r3-116	2748_01_M	9	+	+			
CT1030-15...4-4	Santa Rosa - Meta	IIIX-15-02	138	r3-118	2750_01_C	9	+	+			
No tiene	Tolima - Tolima	VII-26-02	139	r3-119	2751_01_M	6	T	MT			
No tiene	Pompeya - Meta	IIIX-15-02	140	r3-120	2752_01_M	6	T	T			T
No tiene	Pompeya - Meta	IIIX-15-02	141	r3-121	2753_01_M	6					
#26 (LMV26)	La Cumbre - Valle	2002- XI	143	r3-123	2756_01_L	12	+				
Fedearroz 50	Madroño - N. D.	III-00	144	r3-131	2775_F50	5	+	T			
Oryzica 1	Chonche - Tolima	III-00	145	r3-136	2782_Oz1	6					
Oryzica 1	Bausa - Tolima	III-00	146	r3-137	2783_Oz1	6					
Fedearroz 50	Saldaña - Tolima	III-00	147	r3-138	2785_F50	7	+				
Oryzica 1	Espinal - Tolima	III-00	148	r3-139	2786_Oz1	6	+				
Oryzica 1	Saldaña - Tolima	III-99	149	r3-141	2788_Oz1	6					
Fedearroz 50	Saldaña - Tolima	III-99	150	r3-143	2791_F50	6					
Fedearroz 50	Castilla - Tolima	IV-00	151	r3-145	2794_F50	6					
Fedearroz 50	Purificación - Tolima	II-00	153	r3-148	2798_F50	6					
Oryzica 3	Saldaña - Tolima	III-00	155	r3-151	2801_Oz3	6					
ROS P2 ni/04	Uruguay - Uruguay	III-00	156	r3-166	2821_ROS_	6					
Fedearroz 50	San carlos - Meta	II-03	157	r3-168	2823_F50	6					
Fedearroz 50	Pompeya - Meta	II-03	158	r3-169	2824_F50	6					
Fedearroz Victoria 1	N. D. - N. D.	VI- -01	159	r3-190	2705_M_FV	8	+	+			
qR49403006	N. D. - N. D.	XI-08 -01	160	r3-193	2766_qR_6	4	+	+			
Fedearroz 50	Santa Rosa - Meta	V-23-03	162	r3-2770r3	2770r3_F5	9	+	+			
suelo saldaña	Saldaña - Tolima	VII-12-91	163	r3-2390	2390_Rh_s	9	+	+			
Oryzica 1	Tolima - Tolima	III- -93	164	r3-2399c. 1	2399c.1_O	9	+	+			
Oryzica 1	Tolima - Tolima	III- -93	165	r3-2399c3	2399c3_Oz	9	+	+			
Oryzica 1	Tolima - Tolima	III- -93	167	r3-2399-1r	2399_1r_O	9	+	+			

+: Aislamiento que amplificó banda con el primer evaluado. T: Banda de intensidad Tenue. MT: Banda de intensidad mucho muy tenue.

P: Banda de Peso molecular mayor a la mayoría de las bandas amplificadas en la población.

V: Amplificó varias bandas.

L: Banda de Peso molecular menor a la mayoría de las bandas amplificadas en la población.

Nota: Sin letra: los aislamientos que no amplificaron.



**Figura 8.** Electroforesis en geles de agarosa 1,5% del PCR especie específico para la identificación de la especie del hongo *Rhizoctonia solani* en poblaciones de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia con los primers especie específicos GMROS e ITS1 de Johansen y colaboradores (1998) Tabla 1). En cada gel A, B, C, D y E los carriles corresponden a cada uno de los aislamientos del estudio identificados con su posición consecutiva en los geles y a su vez con su número de registro. Los carriles marcados como Control- corresponden a los controles de negativos PCR sin ADN en donde no se obtienen bandas. Como marcador de peso molecular se usó ADN del bacteriófago Lambda digerido con la enzima de restricción PstI (ML PstI). Al margen de cada gel se indica el peso molecular. \*asterisco indica aislamientos no tenidos en cuenta en el estudio. ). PCR especie específico para *Rhizoctonia oryzae-sativae* (combinaciones GMRO-3/R635, y GMRS-4/ITS1), *Rhizoctonia oryzae* (combinación GMRO-3/R635) y *Rhizoctonia solani* (combinación GMROS-6/R635) también fueron realizados (Datos no presentados). (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).



**Tabla 7.** Aislamientos con clasificación molecular de especie con resultados ambiguos en la población CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Aislamiento	Variedad de origen	Lugar de origen	Fecha colecta semestre	Grupo genético	Clasificación de especie por PCR		
1929-01	Oryzica 3	Jamundi, Valle	1.988A	AGS-11	<i>R. solani</i>		<i>R. oryzae</i>
1959-03	Esparcidor	Santa Rosa, Meta	1.987B	AGS-10	<i>R. solani</i>	<i>R. o. sativae</i>	<i>R. oryzae</i>
2768	Fedearroz 2000	Jamundi, Valle	2003A	AGS-1		<i>R. o. sativae</i>	<i>R. oryzae</i>
2752-1	Sin registro	Pompeya, Meta	2002B	AGS-6	<i>R. solani</i>		
1700-02	Oryzica 3	Jamundi, Valle	1.988A	AGS-14	<i>R. solani</i>	<i>R. o. sativae</i>	<i>R. oryzae</i>

### 3.3 DETERMINACIÓN DE VARIANTES RAPD EN LA POBLACIÓN

Los marcadores RAPD, al igual que los Micro satélites y AFLP's tienen la habilidad de dirigirse a regiones del genoma que evolucionan o mutan de rápidamente, contrario a las secuencias de los genes rDNA ribosomal que son evolutivamente muy conservados. Por esto los RAPD resultan útiles en estudios de variabilidad genética intra específica, mientras que los genes rDNA para la determinación o clasificación de especies.

El estudio con el primer RAPD 91298 (Lilja *et al*, 1996) permitió detectar la existencia de más de 14 patrones RAPD distintos en toda la población. La variación de patrones RAPD se observó entre y dentro de aislamientos de especies o grupos genéticos moleculares distintos, entre y dentro de aislamientos de una misma localidad, año y hospedero. También se observaron aislamientos con patrones RAPD parecidos y/o idénticos entre aislamientos de hospederos, localidad y fechas de colecta diferentes, así como entre aislamientos de esclerocios de suelo y aislamientos de tallos y hojas de Fedearroz 50.

Los 26 aislamientos provenientes de la variedad de arroz Cica 4, que serían clasificados en dos grupos genéticos distintos con los marcadores ITS (AGS #6 y 9) mostraron tener más de 7 patrones de RAPD DNA-Fingerprints diferentes (figura 9). Del mismo modo once aislamientos de la variedad Oryzica 3 que serían clasificados en cuatro grupos genéticos distintos (grupos AGS #6, 9, 11 y 14) mostraron 4 tipos distintos de RAPD DNA-Fingerprint. Once de los 26 aislamientos de la variedad Cica 4: Siete de Saldaña y cuatro de Ambalema, obtenidos en dos fechas distintas del semestre 1988A (Asignados al grupo AGS #9) mostraron tener patrones

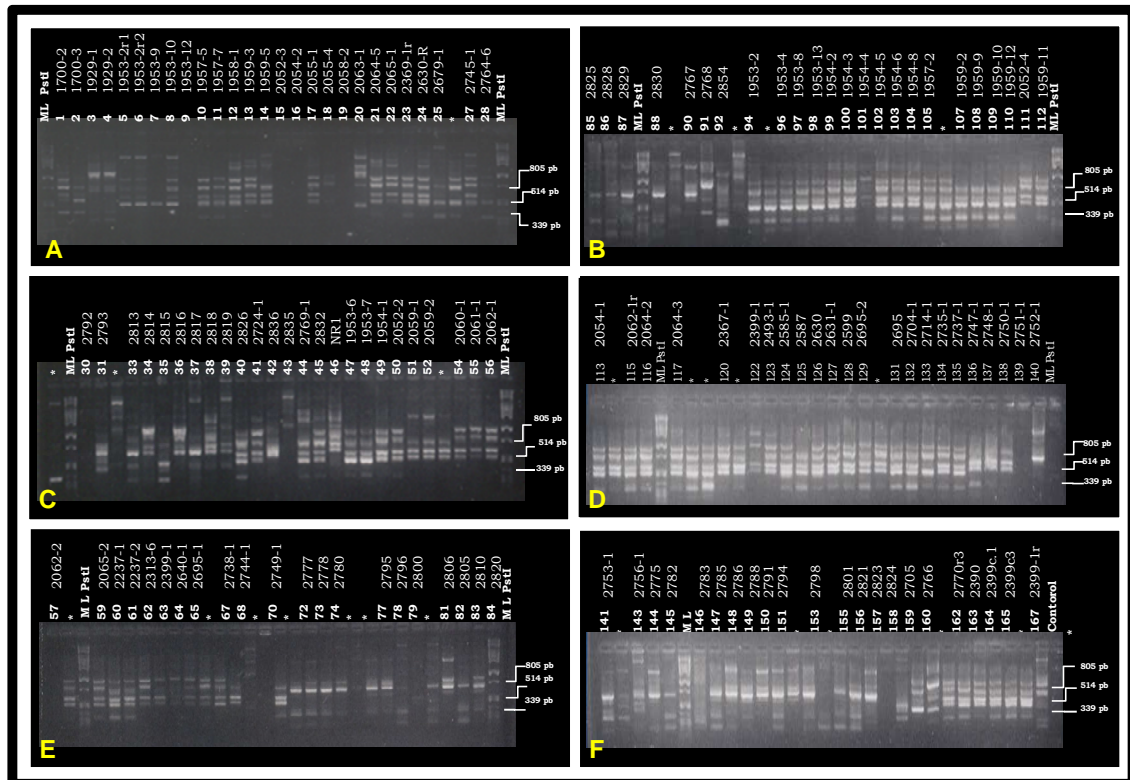
RAPD parecidos: 8 idénticos al del aislamiento 2399 y dos de Ambalema con el patrón RAPD 2399 pero con una banda extra de peso liviano y tenue intensidad (Figura 9).

El aislamiento 2054-01 y seis de los diez aislamientos de la variedad Oryzica 1 (procedentes de Saldaña, 1988A) mostraron el mismo patrón RAPD del aislamiento 2399; otros dos el patrón RAPD 2399 menos una banda y los otros dos no fueron analizados. También los aislamientos 2750-01, 2640-01, 2704-01, 2695, 2599 y 2770 procedentes de hospederos distintos al cultivar Cica 4 y que serían asignados al mismo grupo genético que el aislamiento 2399 (grupo AGS #9) mostraron el patrón RAPD del aislamiento 2399 (Figura 9). Aislamientos del mismo grupo AGS #9 provenientes de varios hospederos mostraron patrones RAPD específicos distintos a patrón RAPD 2399 (aislamientos 1959-03, 1959-05, 1959-02, 1959-09, 2769-01).

De los aislamientos obtenidos de Saldaña y que serían asignados al grupo AGS #9 solo se detectaron dos tipos de patrones RAPD; los mismo para los aislamientos de Saldaña que serían asignados grupo AGS #6. En todo el Tolima además del Fingerprinting 2399 se observaron otros 6 Fingerprints distintos, dos de estos se detectaron también en Santa Rosa (Meta) y uno en Agua Chica (Cesar) (Figura 9).

El patrón RAPD DNA-Fingerprinting más abundante en todo el estudio es el que exhibe el aislamiento 2399. Los aislamientos con el patrón RAPD 2399 fueron obtenidos de variedades como Cica4, Oryzica 1, Oryzica 3 y Fedearroz 50 y estuvo presente en los años de 1987, 1988, 1991, 1993, 1995, 1999, 2000, 2001 y 2003. El poco conocimiento acumulado sobre la variación molecular del patógeno en la región no permiten concluir si los aislamientos que exhiben el patrón RAPD 2399 sean el mismo individuo, aunque todos ellos se encuentran solo en grupo AGS #9.

Es interesante como se observa que desde 1991 pueden encontrarse en el suelo esclerocios de variantes genéticas del hongo como el RAPD DNA-Fingerprint 2399 que en planta han permanecido presentes en casi todos los periodos de cultivo, desde el año 1988 al 2003. Muy posiblemente de haber incluido en este estudio aislamientos de suelo de todos los años, desde 1988 hubiésemos podido detectar cada año la presencia en suelo de la variante RAPD 2399 del hongo y poder determinar así el papel que juega el suelo como reservorio y fuente de inóculo en el cultivo del arroz.

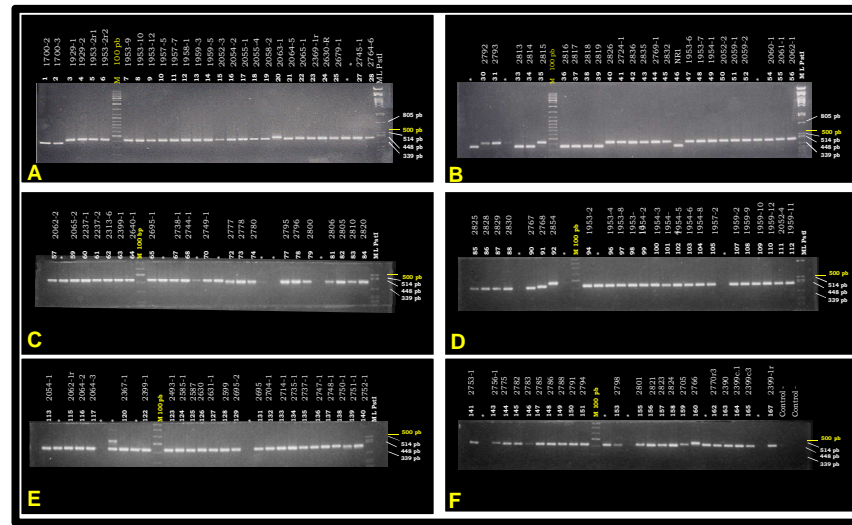


**Figura 9.** Electroforesis en agarosa 1,5% del RAPD DNA-Fingerprinting de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia, con primer RAPD hipervariable 91298 (Lilja *et al*, 1996). En cada gel A, B, C, D y E los carriles corresponden a cada uno de los aislamientos del estudio identificados con su posición consecutiva en los geles y a su vez con su número de registro. Los carriles marcados como Control- corresponden a los controles de negativos PCR sin ADN en donde no se obtienen bandas. Como marcador de peso molecular se usó ADN del bacteriófago Lambda digerido con la enzima de restricción PstI (ML PstI). Al margen de cada gel se indica el peso molecular. \*asterisco indica aislamientos no tenidos en cuenta en el estudio. (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).

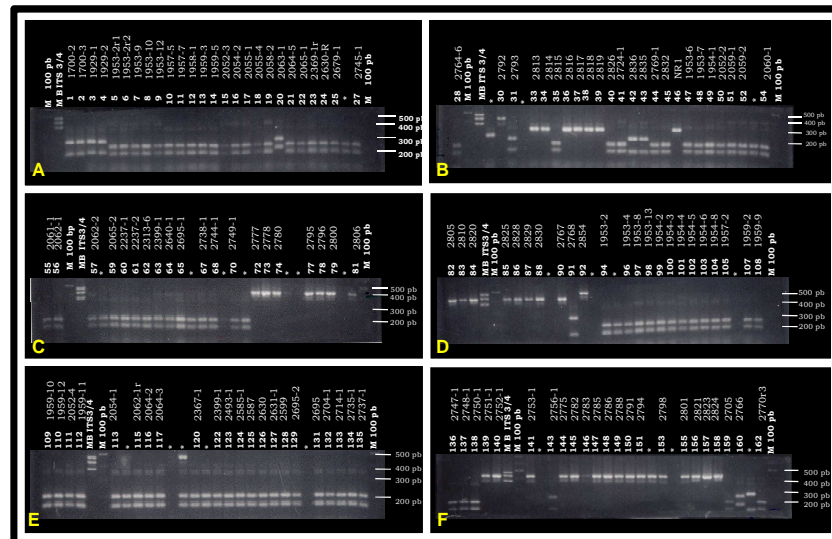
### 3.4 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS ESPACIADORAS DE TRANSCRITO INTERGENICO ITS, DE LOS GENES DE rDNA RIBOSOMAL.

**3.4.1 Amplificación vía PCR de las secuencias ITS.** La amplificación y electroforesis en agarosa de los productos de PCR de las regiones ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4 de los genes rDNA ribosomal (Figura 10) produjo en toda la población un total de dos y cuatro bandas distintas respectivamente.

**3.4.2 Análisis de restricción de las secuencias ITS.** La digestión y electroforesis en agarosa de los productos de PCR de la región ITS3-ITS4 con las cinco enzimas de restricción MboI, EcoRI, TaqI, HaeIII y HinfI produjo un total de 42 bandas diferentes (Anexo C). La digestión de los productos de PCR de la región ITS/ITS2 (Figura 11) generó en la mayoría de los casos, genotipos con una sola banda visible de tamaño muy inferior a la del amplificado original y en algunos casos ninguna banda detectable. La pérdida de fragmentos en las digestiones pudo deberse a que por el menor tamaño de los productos de PCR obtenidos en la región ITS1/ITS2 respecto a la región ITS3-ITS4, sus productos de restricción pudieran ser de un tamaño muy similar, co-migrando en la electroforesis de agarosa en una misma posición o posiciones cercanas imposibles de ser resueltas por dicha matriz (agarosa), dando como resultado la detección de una única banda visible. También es posible que fragmentos de restricción fuesen de un tamaño muy bajo, difíciles de resolver en electroforesis de agarosa. Estudios de restricción de la región ITS1 ITS4 de los genes rDNA ribosomal de 61 aislamientos de *R. solani* AG1, llevados a cabo por Liu y Sinclair (1993) en geles de agarosa, mostraron en las digestiones con las enzimas TaqI y MboI la comigración de productos de restricción de peso similar. También reportan la aparición de bandas parcialmente digeridas de apariencia “fantasma” (bandas muy tenues) debido a la existencia de sitios de corte muy cercanos. Una alternativa para resolver la comigración es hacer electroforesis de los productos de restricción en geles de acrilamida o en las variantes de agarosas con poder de resolución igual al de la acrilamida como las agarosas Metafor, SFR (cia. Amresco) o aditivos como synergel (cia. Diversified Biotech).



**Figura 10.** Electroforesis en geles de agarosa de amplificación PCR de la región ITS3 a ITS4 de los genes de ADN ribosomal de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia. En cada gel A, B, C, D y E los carriles corresponden a cada uno de los aislamientos del estudio identificados con su posición consecutiva en los geles y a su vez con su número de registro. Los carriles marcados como Control corresponden a los controles de negativos PCR sin ADN en donde no se obtienen bandas. Se usaron los marcadores de peso molecular Escalera 100 pares de bases (M 100 pb) y ADN del bacteriófago Lambda digerido con la enzima de restricción PstI (ML PstI). Al margen de cada gel se indica el peso molecular. \*asterisco indica aislamientos no tenidos en cuenta en el estudio. Geles de electroforesis PCR ITS1/ITS2 no se presentan. (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).



**Figura 11.** Electroforesis en geles de agarosa al 3% de la digestión con la enzima de restricción MboI de los productos de PCR de la región ITS3/ITS4 de los genes de ADN ribosomal de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia. Se usó como marcadores de peso molecular la mezcla física de los productos de PCR ITS3/ITS4 de los aislamientos 2063-1, 1929-1 y 1700-2 (MB ITS3/ITS4) y el marcador Escalera 100 pares de bases (M 100 pb). Al margen de cada gel se indica el peso molecular. \*asterisco indica aislamientos no tenidos en cuenta en el estudio. También se realizaron digestiones con las enzimas de restricción HinfI, EcoRI, HaeIII y TaqI (datos no presentados). (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).

**3.4.3 Análisis estadístico de los marcadores ITS.** En este estudio se practicaron dos tipos de análisis: Un análisis de similaridad genética usando el índice de similaridad DICE y un Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM). Todos los análisis fueron practicados solo a la región ITS3/ITS4 de los genes d rDNA ribosomal.

**3.4.3.1 Análisis de similaridad genética de los productos de PCR** (AS-PCR) de las regiones ITS3/ITS4 sin digerir. El análisis de similaridad genética con índice de Dice de los productos de PCR de la región ITS3-ITS4 sin digerir, reveló la existencia de cuatro grupos genéticos constituidos por 1, 3, 127 y 9 individuos respectivamente (Tabla 8, Figura 12). Estos grupos fueron designados como Grupos AS-PCR #1, 2, 3 y 4.

El grupo genético AS-PCR #3 con 127 aislamientos fue el más abundante e incluyó a todos los aislamientos clasificados como *R. solani* por los primers diagnosticadores de especie de Johanson, los aislamientos de *R. solani* provenientes de cultivares de frijol y los aislamientos controles de la especie *R. oryzae-sativae*, entre otros.

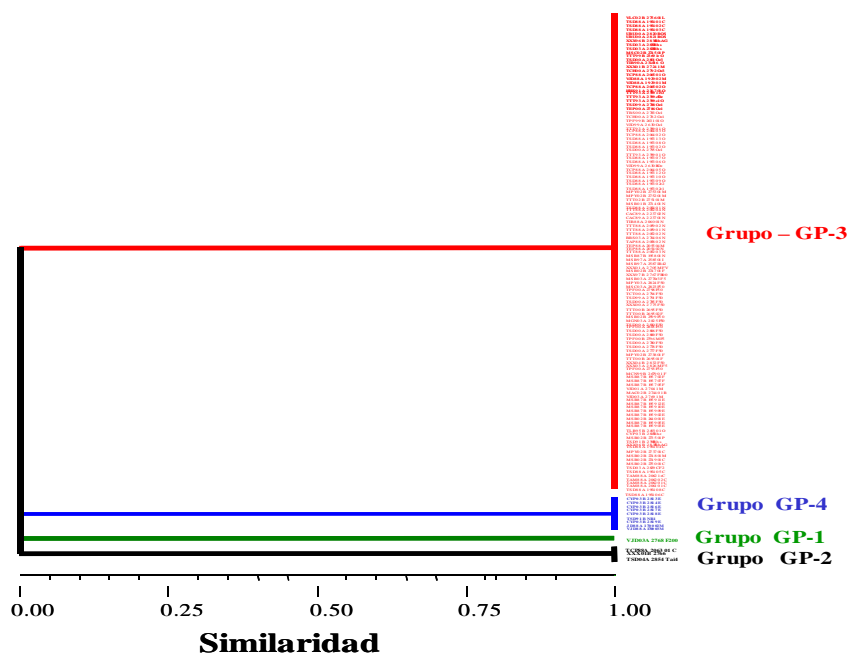
Los grupos AS-PCR #1, #2 y #4 contenían uno, tres y nueve aislamientos respectivamente. El aislamiento único del grupo AS-PCR #1 fue obtenido de la variedad Fedearroz 2000 (registro #2768) colectado en la localidad de Jamundí (Valle) en el primer semestre de 2003; este aislamiento fue clasificado con los primers especie específicos tanto *R. oryzae-sativae* como *R. oryzae*, y en los estudios de morfología desarrollados más adelante en este mismo trabajo exhibiría una morfología única (esclerocios pequeños de color café) atípica a *R. solani*.

El grupo AS-PCR #2 incluyó los tres aislamientos 2063, 2766 y 2854 que fueron clasificados como *R. solani* por los primers especie específicos de Johanson, a pesar que en estudios posteriores de morfología exhibirían rasgos morfológicos atípicos a *R. solani*.

Por otro lado el grupo AS-PCR #4 con 9 aislamientos, contenía seis individuos que fueron incluidos en la colección como *Sclerotium* (micelio de un intenso color negro), dos aislamientos de un mismo origen de hospedero, localidad y fecha (1700-02 y 1700-03) y otro precedente de muestras de suelo de Saldaña. Ningún aislamiento de estos exhibiría morfología típica *R. solani* en la evaluación morfológica desarrollada más adelante en este mismo trabajo.

**Tabla 8.** Relación de las distintas estructuras genéticas o grupos (g) de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia a través del análisis de similitud genética de la región ITS3/ITS4 sin digerir, con digestiones individuales y con el conjunto de digestiones con 5 enzimas de restricción.

Análisis estadístico	No. de Grupos	Número de aislamientos por grupo (en paréntesis)													
AS-PCR	4	g1 (1)	g2 (3)	g3 (127)	g4 (9)										
Dx MboI	7	g1 (1)	g2 (32)	g3 (7)	g4 (1)	g5 (89)	g6 (8)	g7 (2)							
Dx HindI	8	g1 (1)	g2 (2)	g3 (7)	g4 (87)	g5 (9)	g6 (1)	g7 (2)	g8 (31)						
Dx EcoRI	5	g1 (1)	g2 (32)	g3 (3)	g4 (95)	g5 (9)									
Dx HaeIII	7	g1 (1)	g2 (31)	g3 (2)	g4 (1)	g5 (7)	g6 (4)	g7 (94)							
Dx TaqI	5	g1 (1)	g2 (1)	g3 (2)	g4 (127)	g5 (9)									
AGS (5Dx)	14	g1 (4)	g2 (2)	g3 (79)	g4(9)	g5 (1)	g6 (1)	g7 (30)	g8 (1)	g9 (1)	g10 (1)	g11 (1)	g12 (1)	g13 (7)	g14 (2)
PCR + 5DX	14	g1 (4)	g2 (2)	g3 (79)	g4 (9)	g5 (1)	g6 (1)	g7 (30)	g8 (1)	g9 (1)	g10 (1)	g11 (1)	g12 (1)	g13 (7)	g14 (2)



**Figura 12.** Dendrograma de similitud genética de 140 aislamientos de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz basado en la amplificación vía PCR de la región ITS3/ITS4 de los genes de rDNA ribosomal. Se muestra la formación de cuatro grupos genéticos principales (grupos GP) entre los que se destaca el grupo GP-3 con el mayor número de aislamientos (127). El segundo grupo más abundante es el GP-4 con 9 aislamientos. Los grupos GP-1 y GP-2 poseen uno y tres aislamientos respectivamente.

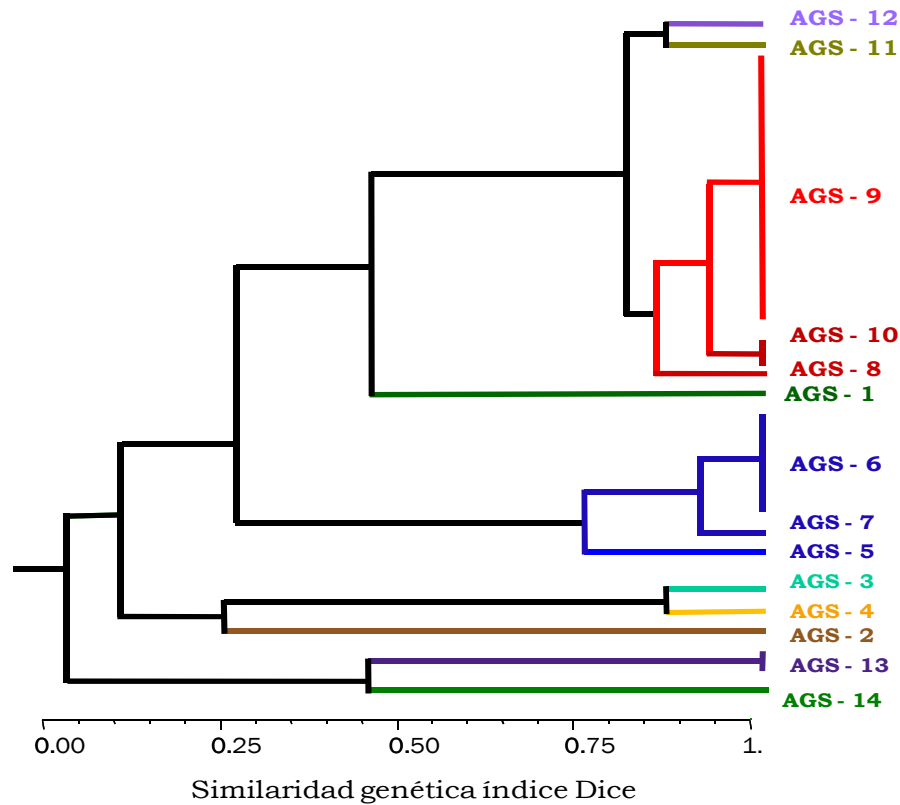
**3.4.3.2 Análisis de Similaridad Genética del estudio de restricción de la región ITS3-ITS4.** Para el estudio de restricción de la región ITS3/ITS4 de los genes rDNA se hicieron dos análisis de similaridad genética: un análisis individual a la matriz de cada una de las digestiones (5 análisis) y un Análisis a la unión de las cinco matrices en una sola matriz global (Anexo D); éste último análisis se designó como Análisis Global de Similaridad AGS).

Análisis de digestiones individuales. El análisis de similaridad genética aplicado de manera individual a cada enzima, mostro una estructura genética de siete grupos para la enzima MboI, ocho grupos para la enzima HinfI, cinco grupos para EcoRI, seis para HaeIII y para la enzima Taq nuevamente cinco grupos (Tabla 8).

Análisis Global de Similaridad a las cinco digestiones. El análisis de similaridad del conjunto de datos de las cinco digestiones de los productos de PCR ITS3-ITS4, clasificó la estructura de la población en 14 grupos genéticos designados grupos AGS (Figura 13). Esta clasificación mantuvo y refinó la especificidad de la clasificación inicial del Análisis de Similaridad de los productos de PCR sin digerir (AS-PCR) (Tabla 9, 8).

Un análisis de similaridad extra practicado a la unión de la matriz global y la de los productos de PCR sin digerir dio la misma estructura poblacional que el análisis Global de Similaridad. Este análisis no fue tenido en cuenta.





**Fig. 13.** Dendrograma de similaridad genética de 140 aislamientos de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz, basado en el análisis de restricción de los productos de PCR de la región ITS3/ITS4 de los genes de rDNA ribosomal. Se muestra la formación de 14 grupos denominados grupos AGS. Los grupos AGS-9 y AGS-6 contienen 79 y 30 aislamientos respectivamente (señalados en paréntesis). Cada grupo tiene un color asignado para su identificación en el dendrograma.

**Tabla 9.** Relación de la composición de grupos genéticos del análisis de similaridad genética aplicado a los productos de PCR sin digerir comparado con los grupos genéticos del ACM del mismo PCR digerido con cinco enzimas de restricción.

Grupos AS-PCR análisis PCR ITS3-ITS4 sin digerir		Grupos AGS análisis PCR ITS3-ITS4 digerido con 5 enzimas	
AS-PCR-1	1 aislamiento	AGS-1	1 aislamiento
AS-PCR-2	3 aislamientos	AGS-3	1 aislamiento
AS-PCR-2		AGS-4	1 aislamiento
AS-PCR-2		AGS-2	1 aislamiento
AS-PCR-4	9 aislamientos	AGS-13	7 aislamientos
AS-PCR-4		AGS-14	2 aislamientos
AS-PCR-3	127 aislamientos	AGS-12	4 aislamientos
AS-PCR-3		AGS-8	1 aislamiento
AS-PCR-3		AGS-7	1 aislamiento
AS-PCR-3		AGS-5	1 aislamiento
AS-PCR-3			

G: Grupo genético. Paréntesis indica el número de aislamientos por grupo genético.

Refinación de la Clasificación AS-PCR a la clasificación AGS. El grupo AS-PCR #4 (PCR sin digerir) contenía 9 aislamientos identificados como no *R. solani*: 6 con morfología *Sclerotium*, uno de suelo de Saldaña y dos de Jamundí que provenían de un mismo origen: 1700-02 y 1700-03. El Análisis Global de Similaridad AGS reclasificó los 6 aislamientos de *Sclerotium* y el de *Rhizoctonia* de suelo en el grupo AGS #13 y los aislamientos de Jamundí en el grupo AGS #14 (Tabla 9). El patrón RAPD de los aislamientos Jamundí fue muy similar entre sí (una banda de diferencia) pero muy diferente a los del resto de la población (Figura 9).

El gran grupo AS-PCR #3 que reunía 127 aislamientos fue reclasificado por el Análisis Global de Similaridad en 8 grupos AGS: los grupos AGS #5, 7 y 8 con un único aislamiento cada uno, el grupo AGS #11 con dos aislamientos, el grupo AGS #12 con cuatro, el grupo AGS #10 con nueve, el grupo AGS #6 con treinta y el grupo AGS #9 con 79 aislamientos. (Tabla 9). Muy posiblemente los aislamientos del grupo AGS #9 sean *R. solani* puesto que en su mayoría provienen de hojas infectadas y fueron identificados en la prueba de PCR como *R. solani*. Nueve de los 12 aislamientos de Fedearroz 50 identificados como *R. solani* se ubicaron en este grupo (Tabla 10).

**Tabla 10.** Reclasificación de los aislamientos de los grupos genéticos AS-PCR del A. C. M. de los productos de PCR sin digerir hacia los grupos genéticos AGS del análisis de similaridad genética de la digestión de dichos fragmentos con cinco enzimas de restricción.

Aislamiento	Procedencia	Grupo AS-PCR	Grupo AGS	Clasificación de especie por PCR*
2399-1, 2369-1r	Control <i>R. solani</i> AG1-IA	3	9	<i>R. solani</i>
2599, 2679-1, 2695, 2695-1, 2695, 2738-1, 2770r3, 2826, 2832f.	Fedearroz 50/ lesión de hojas	3	9	<i>R. solani</i>
2778	Fedearroz 50/ lesión de hojas	3	6	<i>R. solani</i>
2805	Fedearroz 50/ lesión de tallo	3	6	<i>R. solani</i>
2777, 2780m, 2791, 2794, 2796, 2798, 2800, 2806, 2810, 2823M, 2824, 2825.	Fedearroz 50/ lesión de tallo	3	6	"No" <i>R. solani</i>
2820M y 2821M	Control <i>R. oryzae-sativae</i> Uruguay	3	6	Ninguna
2785	Fedearroz 50 / lesión N. D.	3	7	<i>R. solani</i>
2793	Fedearroz 50 / lesión N. D.	3	12	<i>R. solani</i>
2775	Fedearroz 50 / lesión N. D.	3	5	<i>R. solani</i>
2704, 2769	Fedearroz 2.000 / lesión N. D.	3	9	<i>R. solani</i>
2768	Fedearroz 2.000 / lesión N. D.	3	1	<i>R. o. sativae</i> / <i>R. oryzae</i>
2835, 2836	Control <i>R. solani</i> AG1-IA de frijol	3	12	<i>R. solani</i>
2744-1r	<i>Rhizoctonia</i> spp. Pasto <i>Brachiaria</i> spp.	3	9	<i>R. solani</i>
2745	<i>Rhizoctonia</i> de pasto "Estrella"	3	9	<i>R. solani</i>
2390	<i>Rhizoctonia</i> de suelo	3	9	<i>R. solani</i>
2828, 2830.	<i>Rhizoctonia</i> de suelo	3	6	"No" <i>R. solani</i>
1959-3	Arroz esparcidor /lesión N. D.	3	10	<i>R. solani</i> / <i>R. o.sativae</i> / <i>R. oryzae</i>
1929-1	Oryzica 3 /lesión N. D.	3	11	<i>R. solani</i> / <i>R. oryzae</i>
2752-1	Cultivar N. D. / lesión N. D.	3	6	<i>R. solani</i> / <i>R. oryzae</i>
NR1(MER)	<i>Rhizoctonia</i> de suelo	4	13	"No" <i>R. solani</i>
2813, 2816, 2818	<i>Sclerotium</i> spp.	4	13	<i>R. solani</i>
2814, 2817, 2819	<i>Sclerotium</i> spp.	4	13	"No" <i>R. solani</i>
1700-2	Oryzica 3 / lesión N. D.	4	14	<i>R. solani</i> / <i>R. o.sativae</i> / <i>R. oryzae</i>
2768	Fedearroz 2.000 / lesión N. D.	1	1	<i>R. solani</i> / <i>R. oryzae</i>

El grupo AGS #6 incluyó la mayoría de aislamientos de Fedearroz 50 que provenían de tallos y que fueron identificados como no *R. solani* en el diagnóstico por PCR (Tabla 10); también incluyó los dos aislamientos control de la especie *R. oryzae-sativae* (de Uruguay), que de manera interesante no fueron clasificadas como ninguna de las tres especies para las que se diseñaron los primers diagnosticadores de especie de Johanson. Los dos aislamientos controles *R. oryzae-sativae* (2880 y 2821) muestran un patrón RAPD muy similar los dos patrones RAPD que exhiben los aislamientos Fedearroz 50 de tallo: patrones RAPD 2777 y 2780. El

aislamiento 2830 que provino del suelo y también pertenece al grupo AGS #6, muestra el mismo patrón RAPD 2777 de los aislamientos Fedearroz 50 de tallo. La morfología que exhibiría el aislamiento 2777 en los estudios de morfología sería atípica a *R. solani*: micelio blanco con esclerocios superficiales redondos medianos de color café.

Contrario al aislamiento 2830 de suelo de Saldaña, el aislamiento 2390 también del suelo de Saldaña (1991) mostró el patrón RAPD 2399 que representa el patrón típico de *R. solani* y está muy presente en los aislamientos de Fedearroz 50 de hoja asignados al grupo AGS #9. El aislamiento 2830 pertenece al grupo AGS #9. Esto demuestra que en el suelo de una misma localidad conviven tanto esclerocios de especies de *Rhizoctonia* potencialmente virulentas, así como esclerocios de especies inocuas.

La constitución del grupo AGS #6 con características genéticas, morfológicas y patogénicas típicas de la especie *R. oryzae-sativae* (que se describirán más adelante) y la constitución del grupo AGS #9 con características genéticas, morfológicas y patogénicas típicas de *R. solani*, demuestran la efectividad de las regiones ITS de los genes rDNA ribosomal para discriminar especies del género *Rhizoctonia*.

Los dos aislamientos de *R. solani* provenientes de frijol fueron clasificados en el grupo AGS #12 junto con otros dos aislamientos; los dos aislamientos de frijol fueron identificados como *R. solani* en la prueba de PCR.

En cuanto al grupo AGS #11, este reunió solamente dos aislamientos procedentes de Jamundí que fueron aislados de la variedad Oryzica 3 en el año 1988 (1929-01 y 1929-02). Estos dos aislamientos muestran dos RAPD DNA-Fingerprinting muy similares entre sí pero completamente distintos a los del resto de la población. El aislamiento 1929-01 de este grupo mostraría en los estudios de morfología y patogenicidad posteriores, una morfología atípica *R. solani* (micelio café plano) e inocuidad en planta (6.47% APA).

Los grupos AGS #1, #2 y #3 presentan RAPD DNA-Fingerprints muy diferentes de los del resto de la población y que son específicos de para cada grupo. El patrón del grupo AGS #1 es el más distinto de los tres y el del grupo AGS #2 y #3 se parecen más entre sí, compartiendo cinco bandas y mostrando cada uno tres bandas específicas. El grupo #4 mostró un patrón RAPD DNA-Fingerprinting único.

**3.4.3.3 Análisis de Correspondencia Múltiple ACM.** El análisis de correspondencia múltiple (ACM) practicado al conjunto global de datos de las cinco digestiones mas los productos de PCR sin digerir, clasificó la población del patógeno en cinco grupos genéticos designados grupos ACM (Tabla 11, Figura 14) que en general coincide con la clasificación obtenida en el análisis de similaridad de los productos de PCR sin digerir (AS-PCR).

ACM #1 agrupó 96 aislamientos equivalentes al 68% de la población de estudio (Anexo D), abarcando la mayoría de aislamientos identificados vía PCR como *R. solani*, incluidos a dos de pastos que podrían ser patogénicos en arroz: el aislamiento 2745 proveniente de Pasto Argentina (Meta, Semestre 2002B) y el 2744 de *Brachiaria* (Acacias/Meta, semestre 2.002B). A este grupo se signaron también dos aislamientos control de *Rhizoctonia* de frijol.

El grupo ACM #2 incluyó 9 aislamientos correspondientes a los 7 del grupo AGS #13 mas los 2 del grupo AGS #14, que a su vez equivalen a los aislamientos del grupo AS-PCR # 4.

El grupo ACM #3 incluyó 32 aislamientos que en su mayoría fueron identificados como no *R. solani* en las pruebas de PCR. Una vez más los dos aislamientos control obtenidos como *R. oryzae-sativae* fueron agrupados junto a los aislamientos clasificados como no *Rhizoctonia* (grupo ACM #3). Los grupos ACM #1 y ACM #3 tienen una composición similar a los grupos AGS #9 y AGS #6 respectivamente.

El grupo ACM #4 agrupó los aislamientos 2063, 2766 y 2768-01 aislados de vainas y que muestran morfología de esclerocios redondos pequeños. El aislamiento 2768-01 fue identificados vía PCR ambiguamente como *R. oryzae* y *R. oryzae-sativae*, mientras que los otros dos como *R. solani*, a pesar mostrar morfología atípica a *R. solani*.

El grupo #5 ACM incluyó solamente el aislamiento 2854 que en medio artificial de Agar-Salvado exhibía micelio blanco sin esclerocios. Este aislamiento fue obtenido del cultivar de arroz Tailandia 4 en Saldaña, Tolima en el año 2004, sin embargo fue clasificado como *R. solani* por los primers especie específicos. Este aislamiento no pudo ser recuperado para los estudios de patogenicidad y morfología.

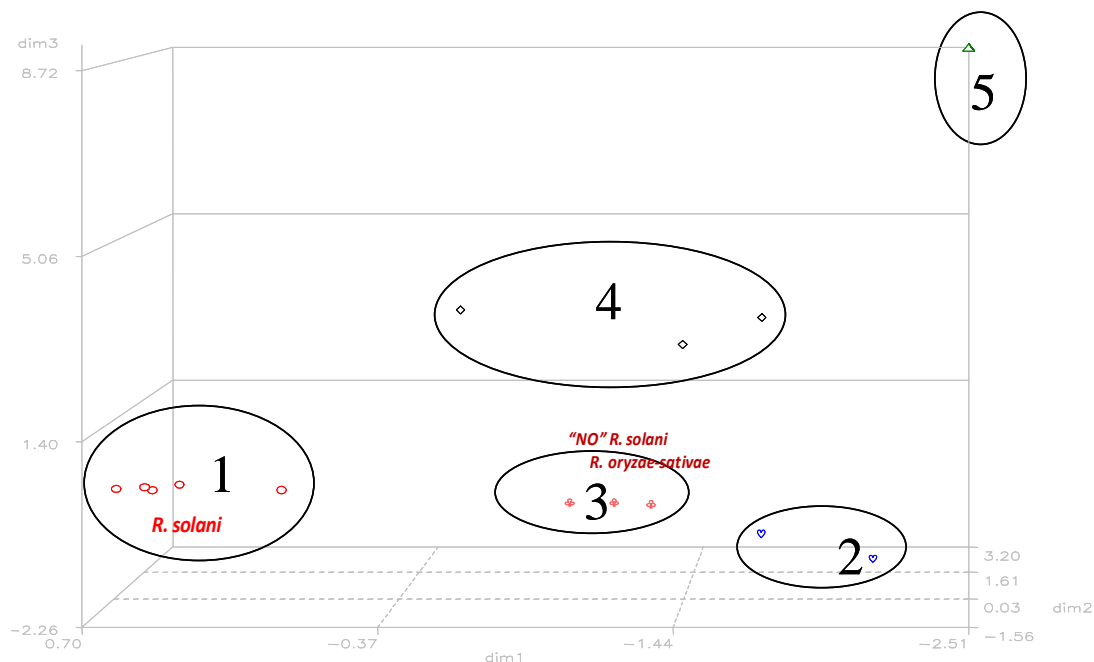
En cuanto a las variedades el ACM permite detectar que los aislamientos de Cica 4 mostraron ser muy similares mientras que los aislamientos provenientes de variedades como Fedearroz 50, Oryzica 1 y Oryzica 3 mostraron ser más diversos genéticamente. Los aislamientos de la variedad Fedearroz 50 en el ACM fueron clasificados en los grupos #1 y #3

con 10 y 16 aislamientos respectivamente (Anexo D); éstos aislamientos fueron reclasificados en el Análisis global de similaridad AGS, en los grupos #5, #6, #7, #9 y #12 con 1, 14, 1, 9 y 1 aislamiento respectivamente (Tabla 9, Figura 13, Tabla 6, Tabla 10). En el grupo ACM #1 los 10 aislamientos mostraron tener más de 5 tipos distintos RAPD DNA-Fingerprinting; y en la clasificación de especie, 7 de los 10 aislamientos fueron diagnosticados como *R. solani*.

En general este estudio (ACM y AGS) mostró la capacidad de las regiones ITS de los genes rDNA ribosomales para esclarecer estructuras genéticas mayores como género, especies y subespecies, al discriminar los aislamientos en grupos genéticos con características específicas compactas como las descritas para los contrastantes grupos AGS #9 y AGS #6, la consolidación de la mayoría de aislamientos de diagnóstico *R. solani* en los grupos AGS #9 y AGS #10, el confinar solo los aislamientos con morfología típica *R. solani* y capacidad de causar la enfermedad en los grupos AGS #8, #9 y #10 (solo se estudiaron 18 aislamientos), el constituir grupos individuales con aislamientos que exhiben patrones RAPD únicos muy distintos al resto de la población (grupos AGS #1, 2, 3 y 4); y a su vez grupos de aislamientos con patrones RAPD mas similares intra grupo que entre grupo: aislamientos de tallos de Fedearroz 50 definidos como no *R. solani* (grupo AGS #6) mostraron patrones RAPD DNA-Fingerprinting similares entre sí y distintos a los aislamientos de la misma variedad pero que eran procedentes de hoja identificados como *R. solani* (grupo AGS #9).

**Tabla 11.** Composición de los grupos genéticos GP del análisis de correspondencia múltiple de los productos de PCR de la región ITS3-ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Grupo ACM	Aislamientos	Porcentaje de la población
1	95	67,86
2	9	6,43
3	32	22,86
4	3	2,14
5	1	0,71



**Figura 14.** Distribución en tres dimensiones de los 4 grupos genéticos principales (grupos GP) del ACM hecho a la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del Añublo de la vaina del arroz en Colombia.

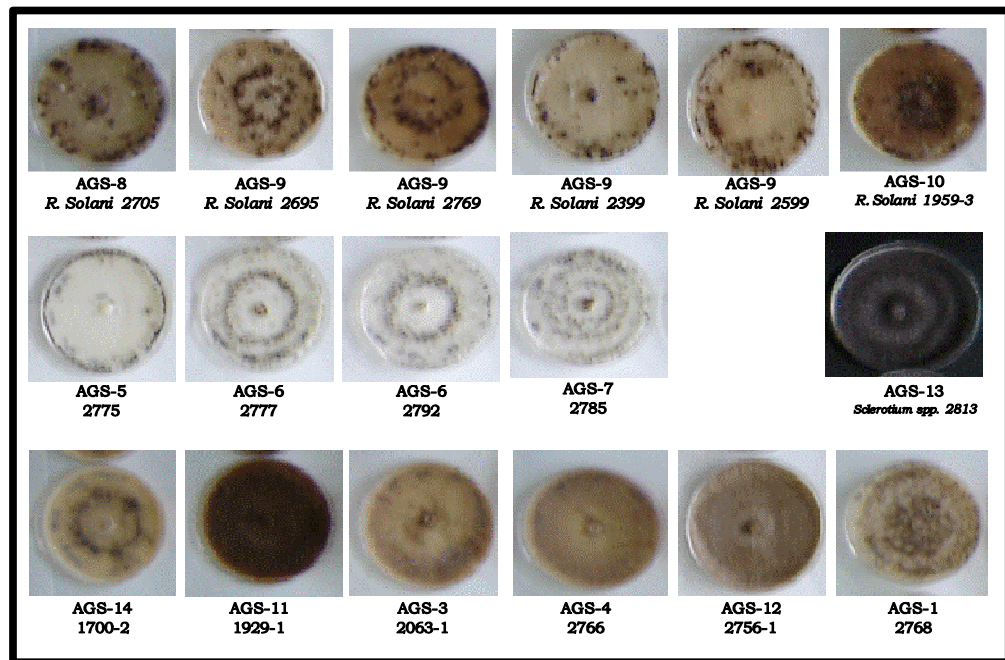
### 3.5 ESTUDIOS DE MORFOLOGÍA.

Para el estudio de morfología se seleccionaron 18 aislamientos de 13 de los 14 grupos genéticos identificados en el Análisis Global de Similitud genética AGS (Tabla 5).

La revisión morfológica arrojó en términos prácticos la formación de dos grandes grupos de aislamientos: un grupo con morfología típica *R. solani* y otro grupo con morfología atípica a *R. solani*. El grupo de aislamientos con morfología típica *R. solani* lo constituyeron los aislamientos de los grupos genéticos AGS #8, 9 y 10. Su morfología en medio PDA fue de micelio superficial, esclerocios color café de forma y borde irregular con superficie rugosa, capacidad de fusionar esclerocios y presencia de exudado color café oscuro en algunos esclerocios (Tabla 12).

El conjunto de aislamientos con morfología atípica *R. solani* fue constituido por los aislamientos del resto de grupos AGS excepto el grupo AGS #2 que no se utilizó al haber perdido su viabilidad; este aislamiento presentaba en medio de agar salvado una morfología única de micelio blanco algodonoso sin esclerocios. En total estos grupos mostraron seis tipos de morfología distinta descritas en la tabla 12. Es destacable que el segundo tipo de

morfología más abundante en el estudio correspondió los aislamientos de los grupos AGS #5, 6 y 7: micelio blanco aéreo con esclerocios superficiales redondos de tamaño mediano y color café (Figura 15).



**Figura 15.** Fotografía de la apariencia morfológica de 18 aislamientos representativos de 13 de los 14 los grupos genéticos que componen la variabilidad genética de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia. Cada número indica el grupo AGS correspondiente a cada aislamiento. (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).



**Tabla 12.** Morfología de 18 aislamientos representativos de 13 de los 14 grupos de diversidad genética de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia

Número de registro	Grupo AGS	Rasgo morfológico principal	Posición foto Figura15
2705	8	Micelio aéreo, esclerocio café irregular, Superficie porosa. Morfología típica <i>R. solani</i> .	1-1
2695, 2769, 2399, 2599	9	Micelio aéreo, esclerocio café irregular, Superficie porosa. Morfología típica <i>R. solani</i> .	1-2, 1-3, 1-4, 1-5
1959-3	10	Micelio aéreo, esclerocio café irregular, Superficie porosa. Morfología típica <i>R. solani</i> .	1-6
2775	5	Micelio blanco, esclerocio redondo mediano.	2-1
2777, 2792	6	Esclerocio redondo mediano.	2-3, 2-4
2785	7	Esclerocio redondo mediano.	2-5
2813	13	Micelio aéreo negro intenso. Morfología típica <i>Sclerotium spp.</i>	2-7
1700-2	14	Micelio amarillo.	3-1
1929-1	11	Micelio café plano.	3-2
2063-1	3	Esclerocio redondo pequeño.	3-3
2766	4	Esclerocio redondo pequeño.	3-4
2756-1	12	Micelio café claro.	3-5
2768	1	Esclerocio café pequeño.	3-6

### 3.6 ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD

La inoculación de las variedades de arroz Fedearroz 2000, Fedearroz 50, Oryzica 1, Oryzica 3 y la especie *Oryza rufipogon*, con los 18 aislamientos representativos de los 13 grupos genéticos ITS3-ITS4 AGS disponibles (de los 14 totales) (Tabla 12), mostró que sólo los 6 aislamientos con morfología típica *R. solani* correspondientes a los grupos AGS #8, #9 y #10 lograron causar enfermedad del añublo de la vaina bajo condiciones controladas de invernadero (Tabla 13, Figura 15, Figura 16, Figura 18). El resto de grupos genéticos inoculados que exhibían morfología atípica a *R. solani* no produjeron la enfermedad; sólo los aislamientos 2775, 2777 y 2785 de los grupos AGS #5, 6 y 7 causaron algunos síntomas similares a los del añublo de la Vaina, que no excedieron al 12% de APA (Tabla 12, Tabla 13, Figura 15, Figura 16, Figura 17 y Anexo H). Consideramos que una planta es susceptible a la enfermedad cuando % APA es superior al 20 %, afectando como mínimo la hoja primaria más baja (hoja #5). Solo las hojas primarias inciden en el rendimiento de la planta.

**Tabla 13.** Promedios de porcentaje de área de planta afectada (%APA) del estudio de patogenicidad de 18 aislamientos representativos de 13 de los 14 grupos de diversidad genética de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

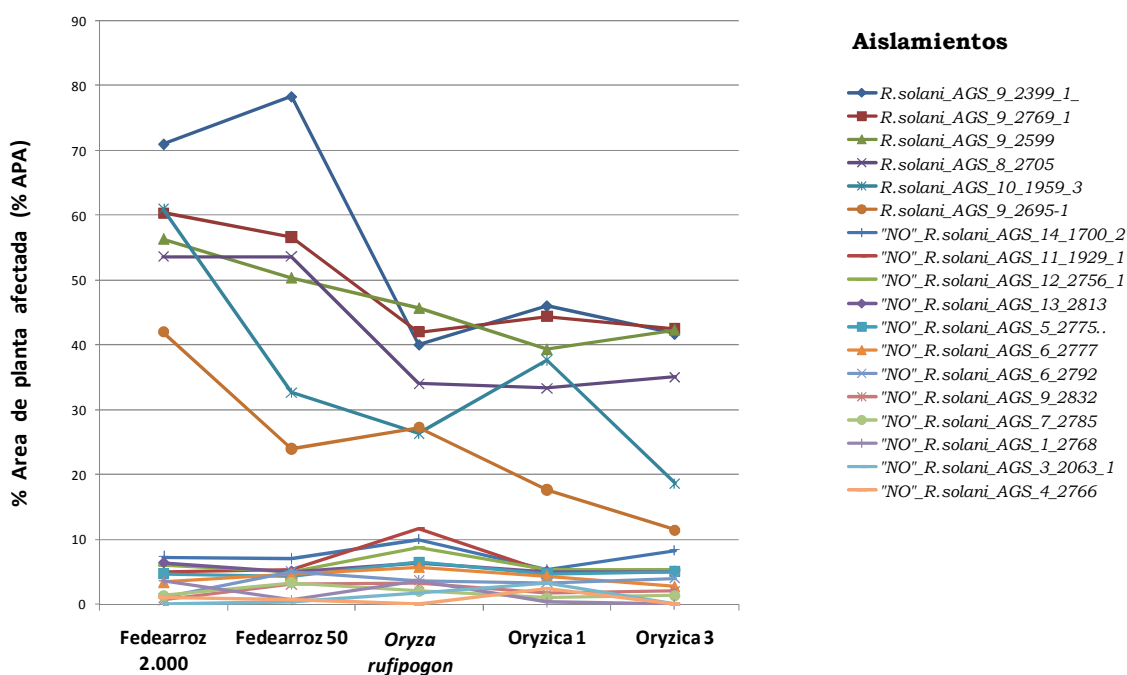
Hospedero	Morfología: *Micelio / +Esclerocio	#Registro	Grupo AS-PCR	Fedearroz 2000 %APA	Fedearroz 50 %APA	Oryzica rufipogon %APA	Oryzica 1 %APA	Oryzica 3 %APA	Promedio Genera% APA	Varianza	Error Estándar
Oryzica1	<i>R. solani</i>	2399_01	9	71	78,33	40	46	41,67	49,4	274,97	1,91
Fedearroz2000	<i>R. solani</i>	2769_1_M	9	60,36	56,67	42	44,33	42,5	49,11	239,82	1,81
Fedearroz50	<i>R. solani</i>	2599	9	56,33	50,33	45,67	39,33	42,31	46,92	358,77	2,22
FD. Victoria 1	<i>R. solani</i>	2705	8	53,67	53,67	34	33,33	35	41,93	349,93	2,16
Espaciador	<i>R. solani</i>	1959_03	10	61	32,67	26,33	37,67	18,67	35,27	541,14	2,69
Fedearroz50	<i>R. solani</i>	2695-1	9	42	24	27,33	17,67	11,47	24,49	298,01	1,99
Oryzica3	micelio Amarillo	1700_02_M	14	7,33	7	10	5,36	8,33	7,64	11	0,39
Oryzica3	café plano	1929_01_M	11	5	5,33	11,67	5	5,33	6,47	10,66	0,38
#26(LMV26)	café claro	2756_01	12	6	5	8,67	5,33	5,33	6,07	6,95	0,03
<i>Sclerotium</i>	<i>Sclerotium</i>	2813	13	6,33	5	6,33	5	5	5,54	3,13	0,21
Fedearroz50	redondo mediano	2775	5	4,67	4,33	6,43	4,67	5	5	4,11	0,24
Fedearroz50	Redondo mediano	2777	6	3,33	4,67	5,67	4,33	2,67	4,13	9,04	0,35
Oryzica3		2792	6	1	5	3,67	3,33	4	3,4	8,89	0,34
Fedearroz50		2832	9	0,67	3	3,21	1,67	2	2,09	6,17	0,29
Fedearroz50	redondo mediano	2785	7	1,33	3,33	2	1	1,33	1,8	6,51	0,29
Fedearroz2000		2768	1	3,67	0,67	3,67	0,33	0	1,67	5,63	0,27
Cica9	redondo pequeño	2063_01	3	0	0,33	1,67	3,33	0	1,07	4,25	0,24
qR45403006	redondo pequeño	2766	4	1	0,67	0	2,33	0	0,8	3,41	0,21

Las variedades Oryzica 1, Oryzica 3 y el cultivar silvestre *Oryza rufipogon* son tolerantes por lo que muestran promedios de %APA menores que las susceptibles Fedearroz 50 y Fedearroz 2.000

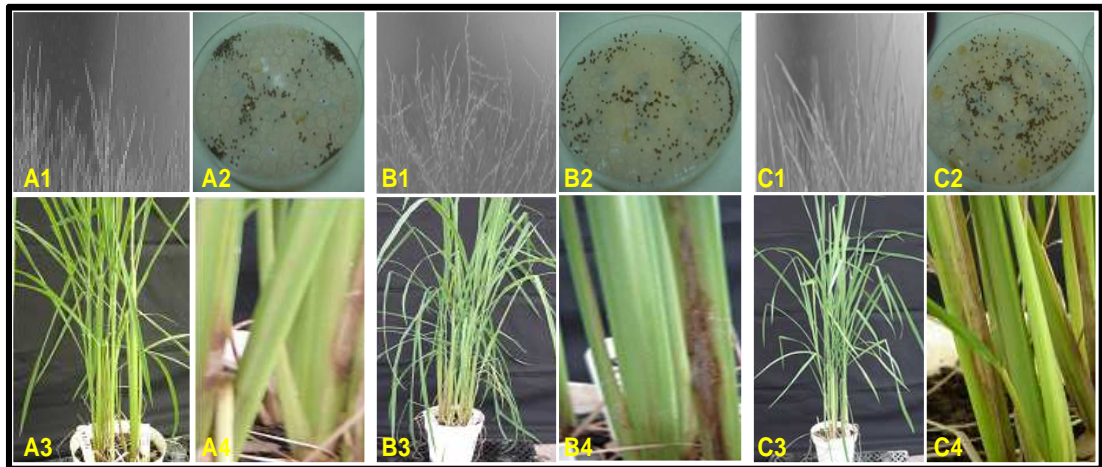
**3.6.1** Patogenicidad de aislamientos con morfología atípica a *R. solani*. Ninguno de los aislamientos de morfología atípica a *R. solani* pudo enfermar a ninguno de los cultivares evaluados: ni las susceptibles Fedearroz 2.000 y Fedearroz 50, ni a los tolerantes Oryzica 1, Oryzica 3 y *Oryza rufipogon*. (Tabla 12, Tabla 13, Figura 16, Figura 17). Sólo algunos aislamientos produjeron leves lesiones en tallo que no revisten ninguna importancia económica para el cultivo del arroz. El aislamiento de 2813 de *Sclerotium* (grupo AGS #13) produjo síntomas en tallo similares a

podrición del tallo que fueron inferiores al 6.4 % de APA. Estos bajos % de APA observados demuestran que las lesiones de campo de donde se obtuvieron los aislamientos de morfología atípica a *R. solani*, fueron causadas por oportunismo sobre lesiones mecánicas de las plantas hospederas.

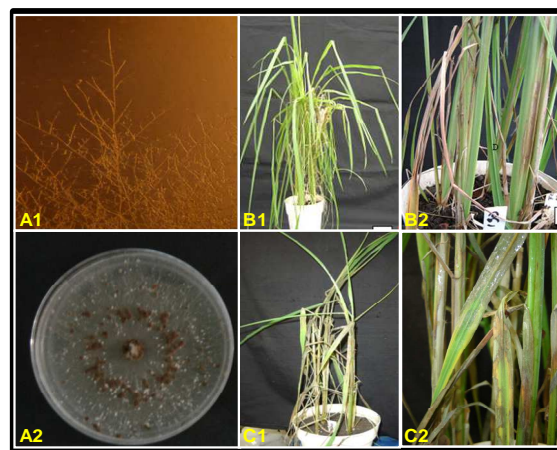
Como las condiciones de inoculación usadas eran estandarizadas solo para el patógeno *R. solani* y no para las otras especies de hongos evaluados, se repitieron las inoculaciones sobre la variedad Fedearroz 50. Las inoculaciones fueron repetidas usando 400% de dosis de inóculo para los aislamientos con morfología atípica *R. solani*, y duplicando el tiempo de incubación. La dosis de inóculo de los aislamientos de morfología *R. solani* se mantuvo igual. Los resultados fueron similares a los de la primera inoculación: los aislamientos con morfología atípica e *R. solani* no reprodujeron la enfermedad (datos no mostrados).



**Figura 16.** Grafica de evaluación de porcentajes de área de planta afectada (%APA) de cinco cultivares de arroz inoculados con 18 aislamientos representativos de la variabilidad genética de la región ITS3 a ITS4 del ADN ribosomal de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia. Solo aislamientos de morfología típica *R. solani* reprodujeron los síntomas típicos de la enfermedad con %APA mayor a 20%. Ningún otro aislamiento del estudio reprodujo los síntomas ni produjo afecciones de tallo superiores al 12% de APA. Las variedades Oryzica 1, Oryzica 3 y el cultivar *O. rufipogon* por ser tolerantes a *R. solani* muestran %APA de la enfermedad menores que las susceptibles Fedearroz 50 y Fedearroz 2.000.



**Figura 17.** Afecciones en tallos de plantas de la variedad Fedearroz 50 inoculadas e incubadas en condiciones controladas de invernadero con aislamientos de morfología atípica a *R. solani* de esclerocios redondos medianos y que no reproducen la enfermedad del añublo de la vaina del arroz. Estos aislamientos a pesar de no causar la enfermedad, si causan afecciones mínimas en tallo que en campo podrían confundirse con lesiones de las etapas tempranas de la enfermedad. A) Aislamiento 2775 del grupo AGS-5. B) Aislamiento 2777 del grupo AGS-6. C) Aislamiento 2785 del grupo AGS-7. A1, B1 y C1: vista al estereoscopio 600X de hifas de micelio de cada aislamiento crecido en medio PDA donde no se observan ángulos rectos en la unión de las hifas. A2, B2 y C2: crecimiento de cada aislamiento en medio de cultivo agar salvado (esclerocio redondo mediano). A3, B3 y C3 plano general de cada planta Fedearroz 50 inoculada, incubada pero sana. A4, B4 y C4: detalle de las afecciones presentadas en los tallos de la variedad Fedearroz 50 que en etapas tempranas de infección en campo podrían confundir al asistente técnico. (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).



**Figura 18.** Sintomatología típica de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz reproducida bajo condiciones controladas de invernadero 76 A1) Vista estereoscopio 600X de hifas del agente causal de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz *R. solani* AGI-1A (aislamiento 2399) crecido en medio PDA. Se observa ángulo recto típico en la ramificación de las hifas. A2) Vista de micelio y esclerocios (cafés, irregulares y de superficie porosa) del aislamiento 2399 crecido en medio PDA. B1) Plano general de la variedad de arroz Fedearroz 50 enferma por la incubación por 15 días con el aislamiento *R. solani* 2705. B2) Detalle lesiones de B1. C1) Plano general de la variedad Fedearroz 2.000 enferma por la incubación por 30 días con el aislamiento *R. solani* 2399. C2) Detalle lesiones de C1 que luce más avanzadas que en B2. (Foto: Fabio Escobar Rioja, 2.005).

### **3.6.2 Patogenicidad de aislamientos con morfología típica *R. solani*.**

El aislamiento con mayor promedio de % APA en los cinco cultivares evaluados fue el 2399 (Tabla 13); este a su vez logró el mayor promedio de % APA en un cultivar individual, específicamente en la variedad Fedearroz 50 con un 78.33% de APA. La segunda variedad más afectada por este aislamiento fue Fedearroz 2000 con 71% de APA. Estos resultados confirman porque este aislamiento es considerado como el más agresivo de la colección y porqué es la base actual del sistema de selección a *R. solani* el programa de mejoramiento de arroz del CIAT (Figura 18A y 18C).

El segundo aislamiento más agresivo fue el 2769 con un promedio general de 49.11% de APA, valor muy cercano al del aislamiento 2399 (ambos del grupo genético AGS #9); y la variedad que mas afectó fue Fedearroz 2000 con 60.36% de APA, seguida por Fedearroz 50 con 56.67% de APA (Tabla 12, Tabla 3, Figura 15).

El aislamiento 2695-01, perteneciente al grupo de los dos aislamiento más agresivos (AGS #9) fue por el contrario el menos agresivo produciendo % APA en las variedades Oryzica 1 y Oryzica 3 inferiores al 20% (Tabla 12, Tabla 3, Figura 15). Los aislamientos 2705 (Figura 18B) y 1959-03 de los grupos AGS #8 y #10, produjeron promedios de % APA de 41.93 y 35.27 respectivamente. Para el aislamiento 1959-03 la variedad Oryzica 3 fue resistente, mostrando un 18,67% de APA % (Tabla 12, Tabla 3, Figura 15).

Los 6 aislamientos con morfología *R. solani* muestran una misma tendencia general en su virulencia consistente en afectar en mayor grado las susceptibles Fedearroz 50 y Fedearroz 2000, y en menor grado a las tolerantes *Oryza rufipogon* (silvestre), Oryzica 1 y Oryzica 3 (Figura 16). Existen algunas interacciones específicas aislamiento cultivar que varían dentro de esta tendencia, como el caso del aislamiento 2399-1 cuya variedad más susceptible es Fedearroz 2000, mientras que para los otros tres aislamientos la variedad más susceptible es Fedearroz 50. También se observa que el aislamiento 2695-1 mostró los niveles de virulencia más bajos para las cuatro variedades (especialmente con Oryzica 1 y Oryzica 3); la interacción del aislamiento 1959-03 y la variedad Oryzica 3 también fue baja. Estas interacciones muy seguramente son mediadas por la interacción de factores genéticos en la planta y el patógeno. La capacidad de individualización de una población de patógenos en unidades informativas diferenciales, dan la capacidad de establecer como es la verdadera relación planta: Patógeno, posibilitarían la identificación de posibles fuentes de resistencia.

Las variaciones patogénicas observadas en los aislamientos del grupo AGS #9 indican que al interior de este grupo existe variación genética que se

pudo verse reflejada en parte por los distintos patrones de RAPD DNA Fingerprinting observados. Es necesario entonces ahondar mucho mas al interior de la variabilidad genética de los grupos AGS # 9, 10 y 8 (de morfología típica *R. solani*) mirando mas finamente con otros marcadores moleculares.

Implicaciones en el mejoramiento: Las tendencias en la patogenicidad que exhibieron los aislamientos *R. solani* seguramente debieron ser determinadas por la respuesta específica de defensa de cada cultivar a cada aislamiento, indicando que cada cultivar posee factores genéticos específicos que interaccionan en distinto grado con factores genéticos específicos de cada aislamiento. Esta interacción determina o modula la respuesta de defensa de la planta. Mediante estudios de patogenicidad más amplios con repeticiones en el tiempo se podrían confirmar estos hallazgos de modo que pudiésemos enfocarnos en identificar estos factores genéticos de la planta y piramidarlos en nuevas variedades de arroz que en teoría serían más tolerantes a la enfermedad.

Debido al incremento de la incidencia de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en el mundo, preocupa la baja tolerancia de las variedades Fedearroz 2.000 y Fedearroz 50. En los últimos años estas han sido una alternativa importante para los agricultores de arroz de Colombia y América Latina por su alta resistencia *Pyricularia*.

Estamos lejos aún de poder identificar cuáles y cuantos factores distintos existen tanto en el patógeno como en la planta, pero si es un avance importante confirmar estas interacciones pueden detectarse al develar la estructura genética de la población del patógeno. Es importante haber constatado la inocuidad y nula importancia económica sobre el arroz que tienen los aislamientos con morfología atípica *R. solana*; se resuelve así la incertidumbre de que en Colombia la enfermedad del añublo de la vaina coexistiera con alguna otra enfermedad de importancia económica. Por lo anterior los esfuerzos de caracterización molecular, patogenicidad y morfología serán dirigidos a los aislamientos de los grupos AGS #8, 9 y 10 y nuevos aislamientos obtenidos de sólo de lesiones de hoja y con morfología típica *R. solani* (no a lesiones de tallo).

#### **4. Conclusiones**

- La colección CIAT de hongos asociados a síntomas del añublo de la vaina del arroz, está constituida en más de un 70% por aislamientos identificados como *R. solani* (grupos AGS #8, 9 y 10).
- La colección CIAT de hongos asociados a síntomas del añublo de la vaina del arroz, está constituida por diversas variantes genéticas RAPD tanto al interior como entre los grupos genéticos moleculares (grupos AGS y ACM), especies, hospederos, localidades y semestres de colecta.
- En los campos de arroz de Colombia, el hongo causante del añublo de la vaina del arroz, coexiste mínimo con otros ocho grupos genéticos de hongos morfológicamente diferentes.
- En Colombia solo aislamientos con identidad molecular y morfología *R. solani*, son capaces de enfermar y reproducir en condiciones de invernadero, la sintomatología típica de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz.
- Posiblemente un solo grupo genético del hongo, y más probablemente el grupo AGS #9, es el más importante en pérdidas económicas para cultivo del arroz en Colombia.

## 5. RECOMENDACIONES

- Desarrollar primers especie específicos a partir de secuencias ITS de los genes rDNA que sean divergentes entre las principales cepas colombianas de *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae-sativae*, *R. oryzae*, *Sclerotium* y demás grupos de hongos identificados en este estudio.
- Realizar estudios de citología y habilidad de anastomosis de los aislamientos de la colección con cepas probadoras de los principales grupos de anastomosis de *R. solani*.
- Realizar estudios de revisión morfológica, patogenicidad y marcadores moleculares de variación rápida (RAPD, RAM's, Rep PCR, etc) a la colección.
- Ampliar la colección de hongos asociados a los síntomas del añublo de la vaina del arroz, tomando solo muestras de hojas infectadas en los dos sistemas de cultivo (riego y seco), buscando equilibrar el aporte de aislamientos por cultivar y lugar de origen.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, N. A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev. Phytopathol. 20: 329-347.
- Baverstock, P. R. and Moritz, C. 1996. Project design. In Molecular Systematics Inc: Massachusetts. U.S.A.
- Biondi N, Piccardi R, Margheri MC, Rodolfi L, Smith GD, Tredici MR . 2004. Evaluation of Nostoc strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. Appl Environ Microbiol. Jun;70(6):3313-20.
- Bridge, P. D. and Arora, D. K. 1998. Interpretation of PCR methods species definition. In Application of PCR in Mycology (eds. P. D. Bridge and Arora, D. K.) pp. 63-83.
- Bunchko, J. and Klassen, G. R. 1990. Detection of length heterogeneity in the ribosomal DNA of *Phythyum ultimum* by PCR amplification of intergenic regions. Current 18: 203-205.
- Burns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. 1991. Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology and Systematics. 22, 525-564.
- Burns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzales, D., Hibbert, D. S., Dane, D. J., Simon, L., Stickel S., Sarro, T. M., Weisburg, W. G. And Sogin, M. L. 1992. Evolutionary relationships within fungi: Analisis of nuclear small subunit rRNA sequences. Molecular Phylogeny and Evolution 1: 231-241.
- Carling, D. E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hifal; anastomosis reaction. In *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease control (B. Sneh, S. Jabaji-Hare, s. Neate, and G. dijt, Eds.), pp 37-47, Kluwer academy, Dordrecht.
- Carling, D. E., Kuninaga, S. And Brainard, K. A. 2001. Hyfal anastomosis reactions, rDNA-Internal Transcribed Spacer Sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-BI. Phytopathology 92 (1) 43-50.
- Castro, C., Davis, J. R., and Wiese, M. V. 1983. Differential medium for identification of *Rhizoctonia solani* AG-3. Plant Dis. 67: 1069-1067.
- Cedeño, L., Nass, H. Carrero, C. Cardona, R., Rodríguez, Z. H. Alemán, L. y Quintero, K. 1995. *Rhizoctonia solani* AG1-IA importante patógeno del

arroz (*Oryza sativa*) en Venezuela. XIV Congreso Venezolano de Fitopatología, Resúmenes Revista Forestal Venezolana. ULA-Mérida. P. 142.

CIAT. 2000. Caracterización de las plagas del arroz y la genética de la resistencia. Informe Anual 2000, Palmira, Colombia. 220pp.

Correa-Victoria, F. 1992. Foro nacional de *Rhizoctonia* en arroz, Bogotá, Abril 9-10 FEDEARROZ.

Correa-Victoria, F. 1997. Principales enfermedades del arroz. En: MIP en arroz: manejo integrado de plagas, artrópodos, enfermedades y malezas. (Pantoja López, Alberto; Fischer, Albert J.; Correa Victoria, Fernando José; Sanint, Luis Roberto; Ramírez, Álvaro; Tascón J., Eugenio; García Durán, Elías. -Eds.) Centro Fundación Polar. FEDEARROZ/FLAR. CIAT. Cali, Col. 141pp.

Cubeta, M. A. and Vilgalys, R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. Phytopathology. 87 (4): 480-484.

Cuevas-Pérez, F. E.; Guimarães, E. P.; Berrío, L. E.; y González, D. I. 1992. Genetic base of irrigated rice in Latin America and the Caribbean 1971 to 1989. Crop Science. 32: 1054-1059.

DNP. 2007. Agenda Interna para la Productividad y la Competitividad, Documento regional, Tolima. Departamento Nacional de Planeación Bogotá, junio. Acceso Septiembre 2.012. Disponible en [www.unibague.edu.co/sitios/pazyregion/images/agendacomo.pdf](http://www.unibague.edu.co/sitios/pazyregion/images/agendacomo.pdf)

Dasgupta, M.K. 1992. Rice sheath blight: The challenge continues. In: Plant diseases of international importance. Vol. 1. Singh, U.S., A.N. Mukopadhyay, J. Kumar and H. S. Chanbe (Eds). Printice Hall, New Jersey. 130-157.

De Bruijn, F. 1992. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genome of *Rhizobium meliloti* isolates, and others soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2180-2187.

Duncan, S., Barton, J. E., O'Brien, P. A. 1993. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by Random Amplified Polymorphic DNA assay. Micol. Res. 97, 1075-1082

Escobar, F y Correa-Victoria, F. Manual POT2-DNA fingerprinting de *Pyricularia grisea*. 1999. Laboratorio de Patología de Arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Palmira, Colombia.

Flor, H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology*. 45: 680-685.

Gabriel, D. and Rolfe, B. 1990. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 365-391.

Gardes, M., White, T. J. Fortin, J. A. Burns, T. D. and Taylor, J. W. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in *ectomycorrhizae* by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* 69: 180-190.

Gardes, M and Burns, T. D. 1993. ITS primer with enhanced specificity for basidiomycetes application of the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.

Glaszmann J.C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 74: 21-30

IRRI. 1996. Standard evaluation system for Rice. IRRI. Los baños, Filipinas. 52pp.

Iwasawa, H. 1987. El añublo de la vaina *Tanatephorus cucumeris*. HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTDA.

Johanson, A., Turner, H. C., McKay, J. C. and Brown A. E. 1998. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae*, *R. oryzae-sativae*. *FEMS Microbiology Letters* 162 (1998) 289-294.

Jones, R. K. and S. B. Belmar, 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* spp. Isolated from rice, soybean and other crop grown in rotation rice in Texas. *Plant Dis.* 73: 1004-1010

Kuninaga, S. and Yokosawa, R. 1979. Some properties of anastomosis group 6 and BI in *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Phytopathol. SOC. JAPAN* 45, 207-214.

Keijer, J., Houterman, P.M., Dulleman, A.M. & Korsman, M.G. 1996. Heterogeneity in electrophoretic karyotype within and between

anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. Mycological Research 100:789-797.

Kuninaga, S. and yokosawa, R. 1982. DNA sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. Genetic relatedness within anastomosis group 1. Ann. Phytopathology. Soc. Japan 48: 659-667.

Khush, G. S. 1977. Disease and insect resistance in rice. Adv. Agron. 29, 265-341.

Kronland, W. C. and Stanghellini. 1988. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*, Phytopathology 78:820-822.

Lamb CJ, Lawton MA, Dron M, Dixon RA. 1989. Signal and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell 56: 215-224.

Laroche, J. P., Jabaji-Here, S. H. and Charest, P. M. 1992. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. Phytopathology 82: 1387-1393.

Lee, F. N. and Rush, M. C. 1983. Rice sheath blight: a major rice disease. Plant. Dis. 67: 829-832.

Lee, S. B. And Taylor, J. W. 1992. Phylogeny of five fungal-like protist species, Inferred from the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. Molecular Biology and Evolution 9: 636-653.

Lilja, A; Hietala, A. M., Karjalainen, A. M. Karjalainen, R. 1996. Identification of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. by pathogenicity, hyphal anastomosis and RAPD Analysis. Plant Pathology (Oxford) 45 (5): 997-1006.

Liu, Z. L. and J. B. Sinclair. 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. Phytopathology. 82: 778-787.

Liu, Z. L. and J. B. Sinclair. 1993. Differentiation of intra-specific groups within anastomosis group of *R. solani* using ribosomal DNA Internal transcribed spacers. Canadian Journal plant pathology. 15:272-280.

- Lubeck, M and Poulsen, H. 2001. UP-PCR cross blot hybridization as a tool for identification of anastomosis groups in the *Rhizoctonia solani* complex. FEMS microbiology letter 201: 83-89.
- Marchetti, M.A. 1983. Potential impact of sheath blight on yield and milling quality of short-statured rice lines in the southern USA. Plant Dis. 67: 162- 165.
- Marshall, D. S. and Rush, M. C. 1980. Relation between infection by *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* on disease severity in rice. Phytopathology 70: 941-946.
- Matsura, K. 1986. Scanning electron microscopy of infection process of *Rhizoctonia solani* in leaf sheaths of rice plants. Phytopathology 76: 811-814.
- Matsumoto, M., Furuya, N. and Matsuyama, N. J. Fac. Agr. 1996. PCR-RFLP analysis of amplified 28S ribosomal DNA for identification of *Rhizoctonia* spp., the causal agents of sheath diseases of rice plants. Kyushu Univ., 41 (1\*2), 39-44.
- Mordue, J. E. M.; R. S. Currah; P. D. Bridge. 1989. An Integrated Approach to *Rhizoctonia* Taxonomy: Cultural, Biochemical and Numerical Techniques», Mycological Research 92:78-90.
- Moore, R. T. 1987. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascho Rhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. Nov., *Ephulorriza* gen. Nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. Mycotaxon 29: 91-99.
- NAS. 1972. Genetic vulnerability of crops. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, Committee on genetic vulnerability of major. Washington D. C.
- Neate, S. M., Cricckshank, R. H, and Rovira, A. D. 1988. Pectic enzyme patterns of *Rhizoctonia solani* isolates from agricultural soils in south Australia. Trans. Brit. Mycol. Soc. 90, 37-42.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia saloni* Kühn. Ann. Rev. Phytopathol. 1987. 25:125-43.
- Ogoshi, A. 1975. Grouping of *Rhizoctonia solani* Khun and their perfect stages. Rev. Plant Prot. Res 8:93-103.
- Ogoshi, A. 1984. Studies on the taxonomy of the genus *Rhizoctonia*. Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 50-307-9.

- Parmeter, J. R., Sherwood, JR., Sherwood, R. T., and Pratt, W. D. 1967. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resembles mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 57: 218-223.
- Parmeter, J. R., JR., R. T. Sherwood, and W. D. Platt. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris* in soil. *Phytopathology* 59: 1270-1278.
- Parlevliet, J. E. 1983. Race specific resistance and cultivar specific virulence in the barley-leaf rust pathosystem and their consequences for the breeding of leaf rust resistant barley. In. *Euphytica*. Vol. 32. P. 367-375.
- Pascual, C. B., Toda, T., Raymondo, A. D. and Hyakumachi, M. 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology* 49: 108-118.
- Rosewich, U.L; Pettway, R. E.; Mcdonald, B. A. and Kistler, H. C. 1999. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. *Fungal Genetics and Biology* 28, 148-159.
- Sanint, L. y S. Wood. 1998. "Impact of rice research in Latin America and the Caribbean during the past three decades". En: Pingali, P y M. Hossain (eds). *Impact of rice research*. Los Baños, Filipinas, International Rice Research Institute.
- Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A. E. and Mills, P. R. 1996. PCR-based detection of *colletotrichum acutatum* of strausbarry. *Plant Pathol.* 45: 650-655.
- Stern, M. J. Ames, G. F. L., Smith, N. H., Robinson, E. C., Higgins, C. F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequence: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37, 1015-1026.
- Stroube, W. H. 1954. Host range of the *Rhizoctonia* aerial blight fungus in Louisiana. *Plant Disease Rep.* 38: 789-790.
- Toda, T., Hyakumachi, M. And Arora, D. K. 1999. Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. *Microbiol. Res.* 154, 247-258.

Versalovich, J. Koeuth, T., Lupsky, J. R. 1991 Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria an application to fingerprint of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19, 6813-6831.

Vilgalys, R. and Hesler, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *cryptococcus* species. Journal of. Bacteriology 172: 4238 - 4246.

Turner, H. C., Rutherford I. M. A., and Singh, U. D. 1999. *Rhizoctonia: Cerberus* in the paddy fields: A new perspective on rice sheath diseases and their causal organisms. Poster: Natural Resources Institute U. K., CABI Bioscience U.K. Central Rice Institute, India.

White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide for methods and applications (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Snisky, J. L. and White, T. J. Eds. Pp 315-332. Academic press, San Diego. CA.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuc. Acids Res, 18: 651-6535.

## ANEXOS

### **ANEXO A.** Protocolo de extracción de ADN de Matthew y Mawhorrr modificado.

- 1- Liofilizar por 16 horas el micelio del hongo que fue crecido de 6 a 8 días en medio líquido completo a temperatura ambiente sin agitación.
- 2- Una vez liofilizado el micelio, depositarlo en un tubo para centrifuga de 15 ml. (polipropileno) y macerar con ayuda de un embolo de vidrio (con punta redondeada) hasta obtener un polvo muy fino y agregarlo a un tubo eppendorf hasta la marca de 500 microlitros (ul).
- 3- Agregar 750 ul de buffer CTAB 2X y con ayuda de una espátula remover el polvo del micelio hasta que este quede re suspendido y con movilidad para posteriormente agregar 15 ul de 2-mercapto etanol. Si hay mucho polvo retirar un poco y almacenarlo en otro tubo.
- 4- Calentar 30 minutos a 65 °C homogeneizando la mezcla de micelio buffer cada 8 minutos.
- 5- Agregar 300 ul de Acetato de Potasio 3M pH 4.8 y Mezclar suavemente por inversión, incubar 15 minutos en hielo.
- 6- Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm para separar las fases; o más tiempo hasta que la fase superior quede transparente. Luego con mucho cuidado tomar la fase superior y depositarla en un tubo nuevo de 1.5 ml. No remover el precipitado.
- 7- Agregar 500 ul de cloroformo: alcohol ISO amílico **24:1**, agitar suavemente y centrifugar 5 minutos a 14.000 r.p.m. o hasta que la fase superior quede transparente. Luego con mucho cuidado tomar 750 ul de la fase superior y depositarla en un tubo nuevo de 1.5 ml que contenga 750 ul de isopropanol frío.
- 8- Almacenar 10 minutos en hielo, luego centrifugar 5 minutos a 14.000 r.p.m. para precipitar DNA. Confirmar que el precipitado no se desprenda.
- 9- Descartar el isopropanol y lavar dos veces con 500 ul de etanol 70% frío. En cada lavado desprender con el vortex el precipitado de ADN.



10- Terminado el lavado descartar el etanol y colocar los tubos invertidos sobre una servilleta durante 5' minutos y dejar secar a temperatura ambiente o 10 minutos en Speed Vacc.

11- Dependiendo del tamaño del botón de ADN obtenido, Agregar de 30 a 50 ul de búfer TE estéril y re suspender muy suavemente.

12- Cuantificar ADN con fluorómetro siguiendo instrucciones del equipo.

#### **ANEXO B.** Tampones o *buffers* de Extracción y de carga de electroforesis

##### - TAMPON O *BUFFER* CTAB 2X.

CTAB	10 gramos
Trizma base	6,06 gramos
EDTA 10mM	1,46 gramos
NaCl 0.7 M	20,5 gramos
Agua bidestilada	500 ml

##### - BUFFER 5X TBE PARA ELECTROFORESIS

Trizma base	54 gramos
Acido Bórico	27,5 litros
0.5M EDTA pH 8.0	20 mililitros
Agua destilada	Llevar a 1 litro

##### - BUFFER DE CARGA BLUE JUICE

Azul de bromo fenol	0,25 gramos
Glicerol	25 mililitros

#### **ANEXO C.** MEDIOS DE CULTIVO, VITAMINAS, MINERALES, SALES

##### MEDIO DE CULTIVO AGAR CON SALVADO DE ARROZ

Agar	20 gramos
Salvado de arroz	20
Agua destilada	1 litro
Para aproximadamente 50 platos petri.	

#### - MEDIO LÍQUIDO COMPLETO

Sales de nitrato	50 mililitros
Elementos traza	1 mililitro
Solución de vitaminas	1 mililitro
D-glucosa	10 gramos
Peptona	2 gramos
Extracto de levadura	1 gramo
Acido casamino	1 gramo
Agua destilada	Hasta completar un litro
Hidróxido de aluminio	Una lentejuela
Disolver los reactivos en el agua verificando pH 6,5	
Empacar en erlenmeyers de 25 ml y autoclavar 25 minutos y presión 120 libras	

#### - SALES DE NITRATO

Nitrato de sodio	12,0 gramos
Cloruro de potasio	10,4 gramos
Sulfato de magnesio	10,4 gramos
Fosfato de potasio	30,4 gramos
Agua destilada	Hasta completar un litro
Disolver los reactivos en el agua	
Empacar en viales de 10 ml y refrigerar a 4 grados centígrados (°C).	

#### - VITAMINAS

Biotina	0,01 gramos
Pyridoxina	0,01 gramos
Tiamina	0,01 gramos
Riboflavina	0,01 gramos
PABA	0,01 gramos
Acido nicotínico	0,01 gramos
Agua destilada	Hasta completar 100 mililitros
Disolver los reactivos en el agua	
Empacar en viales de 10 ml, envolver en papel aluminio y refrigerar a 4 °C.	

- ELEMENTOS TRAZA

ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,2 gramos
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,1 gramos
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,5 gramos
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 gramos
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,17 gramos
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,16 gramos
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,15 gramos
Na <sub>4</sub> .EDTA	5 gramos
Agua destilada	Hasta completar un litro
Hervir y al enfriar a 60 °C calibrar el pH a 6,5 usando KOH	
Empacar refrigerar a 4 grados centígrados (°C).	

**ANEXO D. Condiciones de amplificación de PCR y RAPD.**

PCR de regiones ITS de los genes ADN ribosomal.

Región	Primers	Condiciones de	Amplificación	PCR
ITS1/ITS2	ITS1	95°C - 2 min.	Buffer PCR	1x
	ITS-2	95°C - 0,5 min.	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mili Molar
		60°C - 2 min.	dNTP's	0,2 mili Molar
ITS3/ITS4	ITS3	72°C - 0,5 min.	Primers:	0,5 micro Molar
	ITS4	25 ciclos	Enzima Taq:	1,25 Unidades
		72°C - 10 min.	ADN	25 nano gramos

PCR diagnostico de *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* y *R. oryzae sativae*.

Condiciones de	Amplificación	PCR
95°C - 2 min.	Buffer PCR	1x
95°C - 0,5 min.	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mili Molar
60°C - 2 min.	dNTP's	0,2 mili Molar
72°C - 0,5 min.	Primers:	0,5 micro Molar
25 ciclos	Enzima Taq:	1,25 Unidades
72°C - 10 min.	ADN	25 nano gramos

## PCR RAPD con primer hiper variable 91298

Condiciones de	Amplificación	PCR (Williams <i>et al</i> , 1990.)
95°C - 5 min.	Buffer PCR	1x
95°C - 1 min.	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mili Molar
35°C - 1 min.	dNTP's	0,2 mili Molar
72°C - 2 min.	Primers:	2,5 micro Molar
25 ciclos	Enzima Taq:	1,25 Unidades
72°C - 10 min.	ADN	25 nano gramos

**ANEXO E.** Matriz de datos de PCR y digestión con cinco enzimas de la región ITS3 a ITS4 de los genes de ADN ribosomal de la población CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Carril gel	Código	# de Registro	Hospedero	Fecha	sitio	ITS3/4-1	ITS3/4-2	ITS3/4-3	ITS3/4-4	Dsc-1	Dsc-2	Dsc-3	Dsc-4	Dsc-5	Dsc-6	Dsc-7	Dsc-8	Dsc-9	Dsc-1	Dsc-2	Dsc-3	Dsc-4	Dsc-5	Dsc-6	Dsc-7	Dsc-8	Dsc-9
1	001R	1700_02_M	Oryzica3	88A	Vjdi	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	1700_03_M	Oryzica3	88A	Vjdi	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	1929_01_M	Oryzica3	88A	Vjdi	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4	1929_02_M	Oryzica3	88A	Vjdi	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	005-R1	1953_02r1	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	005-R2	1953_02r2	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	11	1953_09	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	12	1953_10	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	14	1953_12	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	27	1957_05	F3	87B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	28	1957_07	F3	87B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	29	1958_01	No	87B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	32	1959_03	Espaciador	87B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	34	1959_05	Esparcidor	87B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	43	2052_03	No	88A	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	49	2054_02	No	88A	Tepn	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	50	2055_01	No	88A	Tepn	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
18	53	2055_04_M	No	88A	Tepn	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	56	2058_02	No	88A	Tapt	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	63	2063_01	Cica9	88A	Tcpa	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	67	2064_05	Oryzica1	88A	Tcpa	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	68	2065_01	Oryzica3	88A	Tcpa	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	078-b	2369_1r	Oryzicallanos5-1	99B	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	092 br	2630_R	Oryzica1	99A	Vjdi	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	102	2679_01	Fedearroz50	99B	Mcin	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	113	2745_01	PastoArgentina	02B	Manc	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	130	2764_06	No	03A	B	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	140	2787	Fedearroz50	99A	Tepn	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	143-b	2792	Oryzica3	00A	Tche	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	144	2793	Fedearroz50	00A	Tpfc	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	158	2813	Sclerotium_ica	03B	Y	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	159	2814	Sclerotium_ica	03B	Y	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	160	2815	Rhizoctonia_ica	03B	Y	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	161	2816	Sclerotium_ica	03B	Y	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	162	2817	Sclerotium_ica	03B	Y	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	163	2818	Sclerotium_ica	03B	Y	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	164	2819	Sclerotium_ica	03B	Y	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	171	2826_M	Fedearroz50	03A	No	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	191	2724_1_M	Oryzica3	01B	No	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	197	2836	RhAG1_Frijol	96B	No	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	198	2835	RhAG1_Frijol	96B	No	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	202	2769_1_M	Fedearroz2000	03A	Vjdi	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	203	2832	Fedearroz50	04B	No	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	NR1	NR1	RhSueloMER3-4	91B	Tsdñ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	8	1953_06	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### **ANEXO E. (Continuacion)**

Carril gel	Código	# de Registro	Hospedero	Fecha	sitio	TS3/4-1	TS3/4-2	TS3/4-3	TS3/4-4	Dae-1	Dae-2	Dae-3	Dae-4	Dae-5	Dae-6	Dae-7	Dae-8	Dae-9	Dae-1	Dae-2	Dae-3	Dae-4	Dae-5	Dae-6	Dae-7	Dae-8	Dae-9
48	9	1953_07	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
49	16	1954_01	Cica4	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
50	42	2052_02	No	88A	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
51	57	2059_01	No	88A	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
52	58	2059_02	No	88A	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
54	59	2060_01	No	88A	Tibg	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
55	60	2061_01	Cica4?	88A	Tabm	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
56	61	2062_01	Cica4?	88A	Tabm	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
57	62	2062_02	Cica4?	88A	Tabm	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
59	069 -1	2065_02	Oryzica3	88A	Tcpa	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
60	71	2237_01	No	89A	Cach	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
61	72	2237_02	No	89A	Cach	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
62	073db	2313-06	Orizica3	90A	Tibg	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
63	83	2399_01	<u>Oryzica1</u>	93A	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
64	95	2640_01	Esparcidor	02B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
65	106	2695_01	Fedearroz50	00B	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
67	111da	2738_01	Fedearroz50	02B	Mppy	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
68	112	2744_01	<i>RhBrachiaria</i>	02B	Maca	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
70	117	2749_01	CT13478_19_7_1_M	02B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
72	132	2777	Fedearroz50	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
73	133	2778	Fedearroz50	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
74	135	2780	Fedearroz50	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	140	2787	Fedearroz50	99A	Tepn	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0
77	146	2795	Oryzica1	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
78	147	2796_M	Fedearroz50	00B	Tpfc	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
79	150	2800	Fedearroz50	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	154	2806	Fedearroz50	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
82	155	2805	Fedearroz50	00A	Tpfc	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
83	156	2810	Fedearroz50	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
84	165	2820	<i>RhOSP2ni/03</i>	00A	U	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	170	2825	Fedearroz50	03A	Mgnd	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	173	2828	<i>RhSuelo</i>	03A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	174	2829	<u>CF_205</u>	03A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	175	2830	<i>Rh_suelosaldaria</i>	03A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	194	2767	FB007CIAT	97B	No	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
91	201	2768	Fedearroz2000	03A	Vjdi	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
92	2854	2854	Tailandia4	04A	Tsdñ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	5	1953_02	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
96	7	1953_04	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	0
97	10	1953_08	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
98	15	1953_13	Oryzica1	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
99	17	1954_02	Cica4	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
100	18	1954_03	Cica4	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
101	19	1954_04	Cica4	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
102	20	1954_05	Cica4	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
103	21	1954_06	Cica4	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
104	23	1954_08	Cica4	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

**ANEXO E. (Continuación)**

Carril gel	Código	# de Registro	Hospedero	Fecha	sitio	TS/4-1	TS/4-2	TS/4-3	TS/4-4	Doe-1	Doe-2	Doe-3	Doe-4	Doe-5	Doe-6	Doe-7	Doe-8	Doe-9	Doe-10	Doe-11	Doe-12	Doe-13	Doe-14	Doe-15	Doe-16	Doe-17	Doe-18	Doe-19
105	25	1957_02	F3	87B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	31	1959_02	Esparcidor	87B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
108	37	1959_09	Esparcidor	87B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
109	38	1959_10	Esparcidor	87B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
110	40	1959_12	Esparcidor	87B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
111	44	2052_04	No	88A	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
112	46	1959_11	Esparcidor	87B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
113	48	2054_01	No	88A	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
115	061-r1	2062_1r	Cica4?	88A	Tabm	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
116	065da	2064_02	Oryzica1	88A	Tcpa	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
117	66	2064_03	Oryzica1	88A	Tcpa	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
120	78	2367_01	Oryzica3	91A	Htsi	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
122	083-r1	2399_01	Oryzica1	93A	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
123	88	2493_01	OryzicaCaribe8	95B	Tlbs	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
124	89	2585_01	IR8	97A	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
125	90	2587	IR42	97A	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
126	092-bdb	2630	Oryzica1	99A	Vjdi	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
127	93	2631_01	Oryzica1	99B	Tpfc	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
128	99	2599	Fedearroz50	02B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
129	106-bda	2695_02	Fedearroz50	00B	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
131	106-C	2695	Fedearroz50	00B	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
132	107-b	2704_1_M	Fedearroz2000	01A	Vjdi	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
133	108	2714_01	No	01B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
134	109	2735_01	Progreso	02B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
135	110	2737_01	CT13737	02B	Mppy	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
136	115	2747_01	FL00798_7_1p_M	02B	Matr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
137	116	2748_01_M	CT13479_M_2_2_M	02B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
138	118	2750_01	CT1030_15_...4	02B	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
139	119	2751_01_M	No	02B	T	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
140	120	2752_01_M	No	02B	Mppy	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
141	121	2753_01_M	No	02B	Mppy	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
143	123db	2756_01	#26(LMV26)	02B	Vleb	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
144	131	2775	Fedearroz50	00A		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
145	136	2782	Oryzica1	00A	Tche	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
146	137	2783	Oryzica1	00A	Tbsa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
147	138	2785	Fedearroz50	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
148	139	2786	Oryzica1	00A	Tepn	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
149	141	2788	Oryzica1	99A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
150	143	2791	Fedearroz50	99A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
151	145	2794	Fedearroz50	00A	Tctl	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
153	148	2798	Fedearroz50	00A	Tpfc	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
155	151	2801	Oryzica3	00A	Tsdñ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
156	166	2821	RhOSP2ni/04	00A	U	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
157	168	2823	Fedearroz50	03A	Manc	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
158	169	2824	Fedearroz50	03A	Mppy	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
159	190	2705_M	FedearrozVict.1	01A	No	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
160	193	2766	qR49403006	01B	No	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
162	2770 r3new	2770r3new	Fedearroz50	03A	Mstr	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
163	2390	2390	Rhauclosaldana	91B	Tsdñ	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
164	2399c 1	2399c.1	Oryzica1	93A	T	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Dxa-1: Banda 1 de digestión enzima MboI. Dxb-1: Banda 1 de digestión enzima Hindi. I Dxc-1: Banda 1 de digestión enzima EcoRI. Dxd-1: Banda 1 de digestión enzima HaeIII. Dxe-1 Banda 1 de digestión enzima TaqI

**ANEXO F.** Composición de grupos genéticos establecidos mediante análisis de correspondencia múltiple (ACM) de los productos de restricción del PCR de la región ITS3 a ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Obs	nombre	#registro	hospedero	fecha	sitio	dim1	dim2	dim3	grupo	Simbolo	color
							Fig. 20	Fig. 20			
1	BRS03A_2764_06_N	2764_06	No	03A	BRS	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
2	CAC89A_2237_01_N	2237_01	No	89A	CAC	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
3	CAC89A_2237_02_N	2237_02	No	89A	CAC	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
4	CYP03B_2815_Rh_	2815	Rh_ica	03B	CYP	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
5	HRS91A_2367_01_O	2367_01	Ox3	91A	HRS	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
6	MAC02B_2744_01_R	2744_01	RhBrch	02B	MAC	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
7	MCN99B_2679_01_F	2679_01	F50	99B	MCN	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
8	MPY02B_2737_01_C	2737_01	CT13737	02B	MPY	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
9	MPY02B_2738_01_F	2738_01	F50	02B	MPY	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
10	MSC02B_2745_01_P	2745_01	PtA-	02B	MSC	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
11	MSR01B_2714_01_N	2714_01	No	01B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
12	MSR02B_2599_F50	2599	F50	02B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
13	MSR02B_2640_01_E	2640_01	Espac-	02B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
14	MSR02B_2735_01_P	2735_01	Prg	02B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
15	MSR02B_2747_01_F	2747_01	FL_798	02B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
16	MSR02B_2748_01_M	2748_01_M	CT13479	02B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
17	MSR02B_2749_01_C	2749_01	CT13478	02B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
18	MSR02B_2750_01_C	2750_01	CT1030	02B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
19	MSR03A_2770_F5	2770_F3	F50	03A	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
20	MSR87B_1957_02_F	1957_02	F3	87B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
21	MSR87B_1957_05_F	1957_05	F3	87B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
22	MSR87B_1957_07_F	1957_07	F3	87B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
23	MSR87B_1958_01_N	1958_01	No	87B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
24	MSR87B_1959_02_E	1959_02	Espac-	87B	MSR	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
25	MSR87B_1959_03_E	1959_03	Espac	87B	MSR	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
26	MSR87B_1959_05_E	1959_05	Espac-	87B	MSR	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
27	MSR87B_1959_09_E	1959_09	Espac-	87B	MSR	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
28	MSR87B_1959_10_E	1959_10	Espac-	87B	MSR	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
29	MSR87B_1959_11_E	1959_11	Espac-	87B	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
30	MSR87B_1959_12_E	1959_12	Espac-	87B	MSR	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
31	MSR97A_2585_01_I	2585_01	IR8	97A	MSR	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
32	MSR97A_2587_IR42	2587	IR42	97A	MSR	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
33	TAM88A_2061_01_C	2061_01	C4?	88A	TAM	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
34	TAM88A_2062_01_C	2062_01	C4?	88A	TAM	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
35	TAM88A_2062_02_C	2062_02	C4?	88A	TAM	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
36	TAM88A_2062_1_C	2062_1	C4?	88A	TAM	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
37	TAP88A_2058_02_N	2058_02	No	88A	TAP	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
38	TCP88A_2064_02_O	2064_02	Ox1	88A	TCP	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
39	TCP88A_2064_03_O	2064_03	Ox1	88A	TCP	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
40	TCP88A_2064_05_O	2064_05	Ox1	88A	TCP	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
41	TCP88A_2065_01_O	2065_01	Ox3	88A	TCP	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
42	TCP88A_2065_02_O	2065_02	Ox3	88A	TCP	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
43	TEP88A_2054_02_N	2054_02	No	88A	TEP	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
44	TEP88A_2055_04_M	2055_04_M	No	88A	TEP	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
45	TIB88A_2060_01_N	2060_01	No	88A	TIB	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
46	TIB90A_2313_06_O	2313_06	Ox3	90A	TIB	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
47	TLB95B_2493_01_O	2493_01	OC8	95B	TLB	0.58	-0.06	0.05	1	balloon	red
48	TPF00A_2793_F50	2793	F50	00A	TPF	0.47	0.24	0.01	1	balloon	red
49	TPF99B_2631_01_O	2631_01	Ox1	99B	TPF	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
50	TSD88A_1953_02_O	1953_02	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
51	TSD88A_1953_02_F1	1953_02_F1	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
52	TSD88A_1953_02_F2	1953_02_F2	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
53	TSD88A_1953_06_O	1953_06	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
54	TSD88A_1953_07_O	1953_07	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
55	TSD88A_1953_08_O	1953_08	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
56	TSD88A_1953_09_O	1953_09	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
57	TSD88A_1953_10_O	1953_10	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
58	TSD88A_1953_12_O	1953_12	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
59	TSD88A_1953_13_O	1953_13	Ox1	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
60	TSD88A_1954_01_C	1954_01	C4	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
61	TSD88A_1954_02_C	1954_02	C4	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
62	TSD88A_1954_03_C	1954_03	C4	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
63	TSD88A_1954_04_C	1954_04	C4	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
64	TSD88A_1954_05_C	1954_05	C4	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
65	TSD88A_1954_06_C	1954_06	C4	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
66	TSD88A_1954_08_C	1954_08	C4	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
67	TSD88A_2054_01_N	2054_01	No	88A	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
68	TSD91B_2390_Rh_a	2390	Rh_a_sald	91B	TSD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
69	TTT00B_2695_01_F	2695_01	F50	00B	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
70	TTT00B_2695_02_F	2695_02	F50	00B	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red



## ANEXO F. (Continuacion)

Obs	nombre	#registro	hospedero	fecha	sitio	dim1	dim2	dim3	grupo	Simbolo	color
71	TTT00B_2695_F50	2695	F50	00B	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
72	TTT88A_2052_02_N	2052_02	No	88A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
73	TTT88A_2052_03_N	2052_03	No	88A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
74	TTT88A_2052_04_N	2052_04	No	88A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
75	TTT88A_2059_01_N	2059_01	No	88A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
76	TTT88A_2059_02_N	2059_02	No	88A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
77	TTT93A_2399_01_O	2399_01	Ox1	93A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
78	TTT93A_2399_01_O	2399_01	Ox1	93A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
79	TTT93A_2399_1r_O	2399_1r	Ox1	93A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
80	TTT93A_2399c.1_O	2399c.1	Ox1	93A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
81	TTT93A_2399c3_Ox	2399c3	Ox1	93A	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
82	TTT99B_2369_1r_O	2369_1r	OL5	99B	TTT	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
83	VJD01A_2704_1_M	2704_1_M	F2000	01A	VJD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
84	VJD03A_2769_1_M	2769_1_M	F2000	03A	VJD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
85	VJD88A_1929_01_M	1929_01_M	Ox3	88A	VJD	0.10	0.50	-0.18	1	balloon	red
86	VJD88A_1929_02_M	1929_02_M	Ox3	88A	VJD	0.10	0.50	-0.18	1	balloon	red
87	VJD99A_2630_Ox1	2630	Ox1	99A	VJD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
88	VJD99A_2630_R_Ox	2630_R	Ox1	99A	VJD	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
89	VLC02B_2756_01_L	2756_01	LMV	02B	VLC	0.47	0.24	0.01	1	balloon	red
90	XXX01A_2705_M_FV	2705_M	FV1	01A	XXX	0.56	0.07	-0.05	1	balloon	red
91	XXX01B_2724_1_M	2724_1_M	Ox3	01B	XXX	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
92	XXX03A_2826_M_F5	2826_M	F50	03A	XXX	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
93	XXX04B_2832_F50	2832	F50	04B	XXX	0.70	0.12	-0.04	1	balloon	red
94	XXX96B_2835_RhAG	2835	RhAG1_Fr	96B	XXX	0.47	0.24	0.01	1	balloon	red
95	XXX96B_2836_RhAG	2836	RhAG1_Fr	96B	XXX	0.47	0.24	0.01	1	balloon	red
96	CYP03B_2813_E_1c	2813	E_1ca	03B	CYP	-2.13	2.44	-2.26	2	heart	blue
97	CYP03B_2814_E_1c	2814	E_1ca	03B	CYP	-2.13	2.44	-2.26	2	heart	blue
98	CYP03B_2816_E_1c	2816	E_1ca	03B	CYP	-2.13	2.44	-2.26	2	heart	blue
99	CYP03B_2817_E_1c	2817	E_1ca	03B	CYP	-2.13	2.44	-2.26	2	heart	blue
100	CYP03B_2818_E_1c	2818	E_1ca	03B	CYP	-2.13	2.44	-2.26	2	heart	blue
101	CYP03B_2819_E_1c	2819	E_1ca	03B	CYP	-2.13	2.44	-2.26	2	heart	blue
102	TSD91B_NR1_Rh_a	NR1	Rh_a_M3-4	91B	TSD	-2.13	2.44	-2.26	2	heart	blue
103	VJD88A_1700_02_M	1700_02_M	Ox3	88A	VJD	-1.70	1.70	-1.48	2	heart	blue
104	VJD88A_1700_03_M	1700_03_M	Ox3	88A	VJD	-1.70	1.70	-1.48	2	heart	blue
105	MGN03A_2825_F50	2825	F50	03A	MGN	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
106	MPY02B_2752_01_M	2752_01_M	No	02B	MPY	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
107	MPY02B_2753_01_M	2753_01_M	No	02B	MPY	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
108	MPY03A_2824_F50	2824	F50	03A	MPY	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
109	MSC03A_2823_F50	2823	F50	03A	MSC	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
110	TBS00A_2783_Ox1	2783	Ox1	00A	TBS	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
111	TCH00A_2782_Ox1	2782	Ox1	00A	TCH	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
112	TCH00A_2792_Ox3	2792	Ox3	00A	TCH	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
113	TCT00A_2794_F50	2794	F50	00A	TCT	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
114	TEP00A_2786_Ox1	2786	Ox1	00A	TEP	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
115	TFP00A_2798_F50	2798	F50	00A	TFP	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
116	TFP00A_2805_F50	2805	F50	00A	TFP	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
117	TFP00B_2796_M_F5	2796_M	F50	00B	TFP	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
118	TSD00A_2777_F50	2777	F50	00A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
119	TSD00A_2778_F50	2778	F50	00A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
120	TSD00A_2780_F50	2780	F50	00A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
121	TSD00A_2785_F50	2785	F50	00A	TSD	-1.36	-1.56	0.17	3	club	rose
122	TSD00A_2795_Ox1	2795	Ox1	00A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
123	TSD00A_2800_F50	2800	F50	00A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
124	TSD00A_2801_Ox3	2801	Ox3	00A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
125	TSD00A_2806_F50	2806	F50	00A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
126	TSD00A_2810_F50	2810	F50	00A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
127	TSD03A_2828_Rh_a	2828	Rh_a	03A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
128	TSD03A_2829_CF_2	2829	CF_205	03A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
129	TSD03A_2830_Rh_a	2830	Rh_a_salic	03A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
130	TSD99A_2788_Ox1	2788	Ox1	99A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
131	TSD99A_2791_F50	2791	F50	99A	TSD	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
132	TTT02B_2751_01_M	2751_01_M	No	02B	TTT	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
133	URU00A_2820_ROS_3	2820	ROS_3	00A	URU	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
134	URU00A_2821_ROS_4	2821	ROS_4	00A	URU	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
135	XXX00A_2775_F50	2775	F50	00A	XXX	-1.05	-1.11	0.06	3	club	rose
136	XXX97B_2767_FB00	2767	FB007	97B	XXX	-1.22	-1.35	0.14	3	club	rose
137	TCP88A_2063_01_C	2063_01	C9	88A	TCP	-1.68	2.96	2.84	4	diamond	black
138	VJD03A_2768_F200	2768	F2000	03A	VJD	-0.49	2.53	3.10	4	diamond	black
139	XXX01B_2766_qR_6	2766	qR_6	01B	XXX	-1.37	2.65	2.32	4	diamond	black
140	TSD04A_2854_Ta14	2854	Ta14	04A	TSD	-2.51	3.20	8.72	5		

**Anexo G.** Frecuencia de hospederos por grupo genético principal GP del Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) de los productos de PCR ITS3/ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Frecuencia Hospedero	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Total por Hospedero
Cica 4	7	0	0	0	0	7
Cica 4?	4	0	0	0	0	4
Cica 9	0	0	0	1	0	1
CF_205	0	0	1	0	0	1
CT1030	1	0	0	0	0	1
CT13478	1	0	0	0	0	1
CT13479	1	0	0	0	0	1
CT13737	1	0	0	0	0	1
<i>Sclerotium</i> _ICA	0	6	0	0	0	6
Esparcidor	1	0	0	0	0	1
Esparcidor	7	0	0	0	0	7
Fedearroz 2.000	2	0	0	1	0	3
Linea_F3	3	0	0	0	0	3
Fedearroz 50	10	0	16	0	0	26
FB007	0	0	1	0	0	1
FL_798	1	0	0	0	0	1
FV1	1	0	0	0	0	1
IR42	1	0	0	0	0	1
IR8	1	0	0	0	0	1
IMV	1	0	3	0	0	1
No	15	0	0	0	0	18
Oryzica Caribe 8	1	0	0	0	0	1
Oryzica Llanos 5	1	0	0	0	0	1
Oryzica 1	21	0	5	0	0	26
Oryzica 3	7	2	2	0	0	11
Progreso	1	0	0	0	0	1
Pasto Argentina	1	0	0	0	0	1
<i>Rhizoctonia O. sativae</i> _3	0	0	1	0	0	1
<i>Rhizoctonia O. sativae</i> _4	0	0	1	0	0	1
<i>R. solani</i> AG1_Fr	2	0	0	0	0	2
<i>Rhizoctonia</i> Brachiaria	1	0	0	0	0	1
<i>R. solani</i> suelo	0	0	1	0	0	1
<i>R. solani</i> suelo_M3-4	0	1	0	0	0	1
<i>R. solani</i> sueloSaldaña	1	0	1	0	0	2
<i>Rhizoctonia</i> _ICA	1	0	0	0	0	1
Tailandia_4	0	0	0	0	1	1
qr...-6	0	0	0	1	0	1
Total por Grupo	95	9	32	3	1	140

**Anexo H.** Frecuencia de Fecha de colecta por grupo genético principal GP del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de los productos de PCR ITS3/ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Fecha por semestre	Grupo1	Frecuencia de fechas				Total/ año
	Grupo2	Grupo3	Grupo4	Grupo5		
2.000A	1	0	19	0	0	20
2.000B	3	0	1	0	0	4
2.001A	2	0	0	0	0	2
2.001B	2	0	0	1	0	3
2.002B	12	0	3	0	0	15
2.003A	4	0	6	1	0	11
2.003B	1	6	0	0	0	7
2.004A	0	0	0	0	1	1
2.004B	1	0	0	0	0	1
2.087B	11	0	0	0	0	11
1.988A	38	2	0	1	0	41
1.989A	2	0	0	0	0	2
1.990A	1	0	0	0	0	1
1.991A	1	0	0	0	0	1
1.991B	1	1	0	0	0	2
1.993A	5	0	0	0	0	5
1.995B	1	0	0	0	0	1
1.996B	2	0	0	0	0	2
1.997A	2	0	0	0	0	2
1.997B	0	0	1	0	0	1
1.999A	2	0	2	0	0	4
1.999B	3	0	0	0	0	3
Total/grupo	95	9	32	3	1	140

**Anexo I.** Frecuencia de localidad por grupo genético principal GP del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de los productos de PCR ITS3/ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia.

Frecuencia de aislamientos por grupo						
Sitio	Gpo-1	Gpo-2	Gpo-3	Gpo-4	Gpo-5	Total/s
BRS	1	0	0	0	0	1
CAC	2	0	0	0	0	2
CYP	1	6	0	0	0	7
HHS	1	0	0	0	0	1
MAC	1	0	0	0	0	1
MCN	1	0	0	0	0	1
MGN	0	0	1	0	0	1
MPY	2	0	3	0	0	5
MSC	1	0	1	0	0	2
MSR	22	0	0	0	0	22
TAM	4	0	0	0	0	4
TAP	1	0	0	0	0	1
TBS	0	0	1	0	0	1
TCH	0	0	2	0	0	2
TCP	5	0	0	1	0	6
TCT	0	0	1	0	0	1
TEP	2	0	1	0	0	3
TIB	2	0	0	0	0	2
TLB	1	0	0	0	0	1
TPF	2	0	3	0	0	5
TSD	19	1	14	0	1	35
TTT	14	0	1	0	0	15
URU	0	0	2	0	0	2
VJD	6	2	0	1	0	9
VLC	1	0	0	0	0	1
XXX	6	0	2	1	0	9
Total/ grupo	95	9	32	3	1	140

**Anexo J.** Evaluación del porcentaje de área de planta afectada (% APA) de la inoculación de 18 aislamientos que representan la diversidad genética AGS del la región ITS3/ITS4 de la colección CIAT de hongos asociados a la enfermedad del añublo de la vaina del arroz en Colombia

Referencia aislamiento	Morfología	Variedad	Repeti ción	Planta1 % APA	Planta2 % APA	Planta3 % APA	Planta4 % APA	Planta4 % APA
106-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	1	20	30	35	25	40
106-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	2	15	20	25	20	10
106-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	3	5	5	5	5	5
106-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	1	65	65	35	35	35
106-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	2	40	45	55	45	35
106-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	3	30	30	35	45	35
106-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	1	20	15	35	30	15
106-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	2	5	5	5	5	5
106-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	3	10	5	5	6	6
106-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	1	25	40	40	30	45
106-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	2	35	30	30	35	30
106-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	3	5	0	10	30	25
106-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	1	10	40	35	45	65
106-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	2	40	15	25	45	40
106-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	3	0	0	0	0	0
190-8	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	1	15	20	25	10	15
190-8	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	2	70	40	50	45	55
190-8	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	3	25	40	30	35	25
190-8	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	1	35	40	45	35	35
190-8	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	2	90	90	70	70	70
190-8	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	3	55	40	45	40	45
190-8	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	1	20	30	30	30	15
190-8	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	2	40	55	60	45	40
190-8	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	3	15	30	45	30	40
190-8	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	1	25	35	30	35	30
190-8	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	2	30	55	40	40	20
190-8	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	3	35	35	40	30	30
190-8	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	1	20	25	40	30	40
190-8	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	2	80	80	90	70	65
190-8	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	3	60	55	40	65	45
32-10	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	1	15	20	25	30	30
32-10	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	2	65	65	65	65	40
32-10	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	3	25	30	30	30	30
32-10	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	1	30	30	15	40	55
32-10	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	2	85	85	85	85	85
32-10	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	3	55	65	65	75	60
32-10	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	1	5	5	5	10	10
32-10	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	2	25	50	45	35	50
32-10	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	3	5	10	10	10	5
32-10	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	1	25	25	30	20	15
32-10	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	2	40	35	40	40	40
32-10	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	3	20	15	15	20	15
32-10	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	1	5	5	10	10	10
32-10	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	2	55	55	60	55	65
32-10	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	3	35	25	40	40	20
83-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	1	60	60	45	60	60
83-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	2	45	50	55	45	50
83-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	3	35	25	25	35	40
83-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	1	50	75	80	80	60
83-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	2	85	85	85	85	85
83-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	3	55	55	55	60	70
83-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	1	40	50	55	50	45
83-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	2	50	45	35	50	50
83-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	3	35	25	30	35	30
83-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	1	50	40	45	30	45
83-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	2	55	55	40	50	40
83-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	3	20	30	30	35	35
83-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	1	45	60	45	60	60
83-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	2	50	50	70	65	70
83-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	3	30	40	25	35	20

## ANEXO J. (Continuación)

Referencia aislamiento	Morfología	Variedad	Repeti ción	Planta1 % APA	Planta2 % APA	Planta3 % APA	Planta4 % APA	Planta4 % APA
99-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	1	60	85	45	35	45
99-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	2	70	40	50	45	55
99-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 1	3	10	10	10	15	15
99-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	1	60	70	55	75	85
99-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	2	50	65	40	50	55
99-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 2000	3	50	45	50	35	60
99-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	1	45	60	95	55	45
99-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	2	45	45	40	35	N.D.
99-9	<i>R. solani</i>	Oryzica 3	3	25	15	20	25	N.D.
99-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	1	60	55	50	60	45
99-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	2	50	40	40	35	45
99-9	<i>R. solani</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	3	50	35	45	45	30
99-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	1	75	75	75	85	75
99-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	2	30	20	30	25	30
99-9	<i>R. solani</i>	Fedearroz 50	3	55	55	40	40	45
123-12	E* café claro	Oryzica 1	1	5	5	10	5	10
123-12	E* café claro	Oryzica 1	2	5	5	0	5	5
123-12	E* café claro	Oryzica 1	3	5	5	5	5	5
123-12	E* café claro	Fedearroz 2000	1	5	5	5	5	5
123-12	E* café claro	Fedearroz 2000	2	5	5	5	5	10
123-12	E* café claro	Fedearroz 2000	3	10	5	5	10	5
123-12	E* café claro	Oryzica 3	1	5	5	5	5	5
123-12	E* café claro	Oryzica 3	2	5	5	5	5	5
123-12	E* café claro	Oryzica 3	3	5	5	10	5	5
123-12	E* café claro	<i>Oryza rufipogon</i>	1	5	5	5	5	5
123-12	E* café claro	<i>Oryza rufipogon</i>	2	10	10	10	10	10
123-12	E* café claro	<i>Oryza rufipogon</i>	3	15	10	10	10	10
123-12	E* café claro	Fedearroz 50	1	5	5	5	5	5
123-12	E* café claro	Fedearroz 50	2	0	0	5	5	5
123-12	E* café claro	Fedearroz 50	3	5	10	10	5	5
3-11	E* café plano	Oryzica 1	1	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Oryzica 1	2	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Oryzica 1	3	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Fedearroz 2000	1	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Fedearroz 2000	2	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Fedearroz 2000	3	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Oryzica 3	1	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Oryzica 3	2	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Oryzica 3	3	10	5	5	5	5
3-11	E* café plano	<i>Oryza rufipogon</i>	1	15	15	15	15	15
3-11	E* café plano	<i>Oryza rufipogon</i>	2	5	5	5	10	10
3-11	E* café plano	<i>Oryza rufipogon</i>	3	15	15	10	10	15
3-11	E* café plano	Fedearroz 50	1	5	10	5	5	5
3-11	E* café plano	Fedearroz 50	2	5	5	5	5	5
3-11	E* café plano	Fedearroz 50	3	5	5	5	5	5
1-14	micelio Amarillo	Oryzica 1	1	5	5	5	5	N.D.
1-14	micelio Amarillo	Oryzica 1	2	5	10	5	5	5
1-14	micelio Amarillo	Oryzica 1	3	5	5	5	5	5
1-14	micelio Amarillo	Fedearroz 2000	1	5	5	5	5	5
1-14	micelio Amarillo	Fedearroz 2000	2	15	5	5	15	10
1-14	micelio Amarillo	Fedearroz 2000	3	5	10	5	5	10
1-14	micelio Amarillo	Oryzica 3	1	10	10	5	10	5
1-14	micelio Amarillo	Oryzica 3	2	10	10	15	15	10
1-14	micelio Amarillo	Oryzica 3	3	5	5	5	5	5
1-14	micelio Amarillo	<i>Oryza rufipogon</i>	1	15	15	10	10	15
1-14	micelio Amarillo	<i>Oryza rufipogon</i>	2	5	10	10	5	5
1-14	micelio Amarillo	<i>Oryza rufipogon</i>	3	10	10	10	10	10
1-14	micelio Amarillo	Fedearroz 50	1	5	5	5	5	5
1-14	micelio Amarillo	Fedearroz 50	2	10	5	10	5	10
1-14	micelio Amarillo	Fedearroz 50	3	5	10	10	5	10
132-6	E* redondo mediano	Oryzica 1	1	5	5	5	5	5
132-6	E* redondo mediano	Oryzica 1	2	5	5	5	5	5
132-6	E* redondo mediano	Oryzica 1	3	5	5	5	0	0
132-6	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	1	0	5	5	0	5
132-6	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	2	10	5	5	5	5
132-6	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	3	5	0	0	0	0
132-6	E* redondo mediano	Oryzica 3	1	5	5	0	5	5
132-6	E* redondo mediano	Oryzica 3	2	0	0	5	0	0
132-6	E* redondo mediano	Oryzica 3	3	5	5	5	0	0
132-6	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	1	5	5	5	5	5
132-6	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	2	10	5	10	10	10
132-6	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	3	5	5	5	0	0
132-6	E* redondo mediano	Fedearroz 50	1	10	5	5	10	5
132-6	E* redondo mediano	Fedearroz 50	2	0	10	5	5	5
132-6	E* redondo mediano	Fedearroz 50	3	5	5	0	0	0

## ANEXO J. (Continuación)

Referencia aislamiento	Morfología	Variedad	Repeti ción	Planta1 % APA	Planta2 % APA	Planta3 % APA	Planta4 % APA	Planta4 % APA
131-5	E* redondo mediano	Oryzica 1	2	10	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	Oryzica 1	3	5	5	5	0	0
131-5	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	1	5	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	2	5	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	3	5	10	5	0	0
131-5	E* redondo mediano	Oryzica 3	1	5	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	Oryzica 3	2	5	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	Oryzica 3	3	5	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	1	10	10	10	5	5
131-5	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	2	5	5	5	10	N.D.
131-5	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	3	5	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	Fedearroz 50	1	5	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	Fedearroz 50	2	5	5	5	5	5
131-5	E* redondo mediano	Fedearroz 50	3	5	5	5	0	0
138-7	E* redondo mediano	Oryzica 1	1	5	0	5	0	0
138-7	E* redondo mediano	Oryzica 1	2	0	0	5	0	0
138-7	E* redondo mediano	Oryzica 1	3	0	0	0	0	0
138-7	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	1	5	0	5	0	0
138-7	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	2	0	0	0	0	0
138-7	E* redondo mediano	Fedearroz 2000	3	5	5	0	0	0
138-7	E* redondo mediano	Oryzica 3	1	0	0	0	0	0
138-7	E* redondo mediano	Oryzica 3	2	5	5	0	0	5
138-7	E* redondo mediano	Oryzica 3	3	5	0	0	0	0
138-7	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	1	5	0	0	5	0
138-7	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	2	0	0	5	0	5
138-7	E* redondo mediano	<i>Oryza rufipogon</i>	3	5	5	0	0	0
138-7	E* redondo mediano	Fedearroz 50	1	5	0	5	5	5
138-7	E* redondo mediano	Fedearroz 50	2	0	5	10	5	0
138-7	E* redondo mediano	Fedearroz 50	3	5	5	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	Oryzica 1	1	0	0	0	5	0
193-4	E* redondo pequeño	Oryzica 1	2	5	5	5	5	5
193-4	E* redondo pequeño	Oryzica 1	3	5	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	Fedearroz 2000	1	0	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	Fedearroz 2000	2	0	0	0	5	0
193-4	E* redondo pequeño	Fedearroz 2000	3	5	5	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	Oryzica 3	1	0	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	Oryzica 3	2	0	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	Oryzica 3	3	0	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	<i>Oryza rufipogon</i>	1	0	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	<i>Oryza rufipogon</i>	2	0	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	<i>Oryza rufipogon</i>	3	0	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	Fedearroz 50	1	5	0	0	0	5
193-4	E* redondo pequeño	Fedearroz 50	2	0	0	0	0	0
193-4	E* redondo pequeño	Fedearroz 50	3	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Oryzica 1	1	5	5	5	5	0
63-3	E* redondo pequeño	Oryzica 1	2	5	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Oryzica 1	3	5	5	5	5	5
63-3	E* redondo pequeño	Fedearroz 2000	1	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Fedearroz 2000	2	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Fedearroz 2000	3	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Oryzica 3	1	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Oryzica 3	2	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Oryzica 3	3	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	<i>Oryza rufipogon</i>	1	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	<i>Oryza rufipogon</i>	2	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	<i>Oryza rufipogon</i>	3	5	5	5	5	5
63-3	E* redondo pequeño	Fedearroz 50	1	0	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Fedearroz 50	2	5	0	0	0	0
63-3	E* redondo pequeño	Fedearroz 50	3	0	0	0	0	0
158-13	<i>Sclerotium</i>	Oryzica 1	1	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Oryzica 1	2	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Oryzica 1	3	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Fedearroz 2000	1	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Fedearroz 2000	2	5	5	5	10	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Fedearroz 2000	3	5	10	10	5	10
158-13	<i>Sclerotium</i>	Oryzica 3	1	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Oryzica 3	2	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Oryzica 3	3	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	1	5	5	0	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	2	5	10	10	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	3	10	5	5	10	10
158-13	<i>Sclerotium</i>	Fedearroz 50	1	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Fedearroz 50	2	5	5	5	5	5
158-13	<i>Sclerotium</i>	Fedearroz 50	3	5	5	5	5	N.D.